

Identifizierung und Analyse
neuer symbioserelevanter Genorte
in *Bradyrhizobium japonicum* 110spc4

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Bernd Ulrich Becker

aus Heppenheim

Marburg/Lahn 2002

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 24.10.2002 angenommen.

Erstgutachter Herr Prof. Dr. D. Werner

Zweitgutachter Herr PD Dr. P. Franken

Tag der mündlichen Prüfung am 28.10.2002

This work is dedicated to love,
the symbiosis of souls.

Entscheidende Teile der vorliegenden Arbeit sollen in den folgenden Publikationen veröffentlicht werden (Manuskripte in Arbeit):

Integrase gene *intA* of *Bradyrhizobium japonicum* 110*spc4* plays a crucial role in the symbiosis with *Glycine max*

A novel gene of *Bradyrhizobium japonicum*, encoding a putative selenoprotein, is required for an effective symbiosis with soybean *Glycine max*

Symbiotic relevance of *sbp* from *Bradyrhizobium japonicum*, encoding a potential selenium binding protein, in the interaction with soybean

Die vorliegende Arbeit wird als Ganzes im Internet veröffentlicht

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden für die Anfertigung der folgenden Publikation verwendet:

Tomkins, J. P., Wood, T. C., Stacey, M. G., Loh, J. T., Judd, A., Goicoechea, J. L., Stacey, G., Sadowsky, M. J., Wing, R. A. (2001):

A marker-dense physical map of the *Bradyrhizobium japonicum* genome. Genome Res. 11 (8), 1434-1440

Im Laufe des Promotionszeitraumes wurde der jeweils aktuelle Stand der Forschungen den Fachkollegen zugänglich gemacht und mit diesen diskutiert:

B. U. Becker, V. Boiffin, D. Werner, P. Müller:

BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM 2-10: A TnpA-INSERTION MUTANT WITH SERIOUS DEFECTS IN THE SYMBIOSIS WITH *GLYCINE MAX*. 9th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 25.-30.07.1999, Amsterdam, Niederlande
Als Posterbeitrag und im Book of Abstracts veröffentlicht.

B. U. Becker:

GENETIC ANALYSIS OF THE SYMBIOTIC *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* MUTANT 2-10

„Interaktion, Anpassung und katalytische Fähigkeiten von Bodenmikroorganismen“, Herbstkonferenz 1999 des Sonderforschungsbereich 395 der Deutschen Forschungsgemeinschaft, 13.-14.12.1999, Rauischolzhäusen, Deutschland
Als Vortrag veröffentlicht.

B. U. Becker, V. Boiffin, D. Werner, P. Müller:

GENETIC ANALYSIS OF THE SYMBIOTIC *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* MUTANT 2-10. Third International Congress on Symbiosis, 13.-19.08.2000, Marburg, Deutschland
Als Poster veröffentlicht.

B. U. Becker, V. Boiffin, D. Werner, P. Müller:

GENETIC ANALYSIS OF THE SYMBIOTIC *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* MUTANT 2-10. Fourth European Nitrogen Fixation Conference, 16.-20.09.2000, Sevilla, Spanien
Als Posterbeitrag und im Book of Abstracts veröffentlicht.

B. U. Becker, G. Wiedemann, R. Pöschke, E. Mörschel, D. Werner, P. Müller

A NOVEL GENE OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*, ENCODING A PUTATIVE SELENOPROTEIN, IS REQUIRED FOR AN EFFECTIVE SYMBIOSIS WITH SOYBEAN. Fifth European Nitrogen Fixation Conference, 06.-10.09.2002, Norwich, England
Als Posterbeitrag und im Book of Abstracts veröffentlicht.

Darüberhinaus wurde zu folgenden Publikationen entscheidend beigetragen:

A. Bairl, B. U. Becker, V. Boiffin, P. Vinuesa, T. Winzer, P. Müller (1998):

MULTIPLE ALLELIC SIGNAL PEPTIDASE GENES OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* STRAINS AND THEIR ROLES IN THE SYMBIOTIC INTERACTION. Third European Nitrogen Fixation Conference, 20.-24.09.1998, De Blijde Wereld in Lunteren, Niederlande
Als Posterbeitrag und im Book of Abstracts veröffentlicht.

U. Becker, V. Boiffin, E. Mühlencoert, D. Stingel, P. Müller (2000):

IDENTIFYING AND ANALYZING *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* GENES ENCODING EXTRACYTOPLASMATIC PROTEINS BY IN VIVO AND IN VITRO MUTAGENESIS. Third International Congress on Symbiosis, 13.-19.08.2000, Marburg, Deutschland
Als Vortrag, als Poster und im Book of Abstracts veröffentlicht.

B. U. Becker, D. Stingel, P. Müller:

IN VITRO MUTAGENESIS OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM sipF* GENETIC REGION BY A NOVEL TRANSPOSON TnKPK2. Fourth European Nitrogen Fixation Conference, 16.-20.09.2000, Sevilla, Spanien
Als Posterbeitrag und im Book of Abstracts veröffentlicht.

Dieses Poster wurde als eines der drei besten Poster der Konferenz mit einem Posterpreis ausgezeichnet.

H. L. Steele, B. U. Becker, P. Müller, P. Vinuesa, D. Werner (2001):

REGULATION OF AMINO ACID TRANSPORTER AAP UNDER ACIDIC CONDITIONS. Nitrogen Fixation: Global Perspectives
Turlough M. Finan, Mark R. O'Brian, David B. Layzell, J. Kevin Vessey and William Newton (editors)
Sowie als Posterbeitrag bei dem 13th International Congress on Nitrogen Fixation, 02.-07.07.2001, Hamilton (Ontario), Kanada
veröffentlicht.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
1. EINLEITUNG.....	1
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1. Geräte	11
2.2. Chemikalien und Materialien.....	13
2.2.1. Feinchemikalien und Verbrauchsmaterial	13
2.2.2. Enzyme.....	15
2.2.3. Nährmedien	15
2.2.4. Kits	15
2.2.5. Puffer und Lösungen.....	16
2.3. Bakterienstämme	19
2.4. Vektoren	20
2.4.1. Verwendete Vektoren	20
2.4.2. Konstruktion der Vektoren pNVmob und pNVDEmob.....	21
2.5. Primer	22
2.6. Sterilisation von Verbrauchsmaterial und Nährmedien	24
2.7. Anzucht und Stammhaltung von Bakterien.....	25
2.7.1. Nährmedien zur Anzucht von <i>B. japonicum</i> Stämmen	25
2.7.2. Nährmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i> Stämmen.....	27
2.7.3. Konzentrationen von Antibiotika und anderen Zusätzen	28
2.7.4. Anzuchtbedingungen von Bakterienkulturen.....	29
2.7.5. Stammhaltung von Bakterienkulturen	29
2.8. Anzucht und Wachstumsbedingungen der Pflanzen	30
2.8.1. Keimung und Anzucht von <i>Glycine max</i>	30
2.8.2. Inokulation der Pflanzen	30
2.8.3. Wachstumsbedingungen im Pflanzentest.....	30
2.9. In vivo Tests zur Aktivitäts Bestimmung bakterieller Enzyme	31
2.9.1. Acetylenreduktionstest.....	31
2.9.2. Weichagartest.....	32
2.10. Isolierung von DNA aus Bakterien.....	32
2.10.1. Minipräparation von Plasmiden	32
2.10.2. Minipräparation von Plasmiden unter Verwendung des Macherey Nagel Systems	33
2.10.3. Isolierung von Gesamt DNA aus Bakterien.....	34
2.11. Präzipitation von DNA	35
2.12. Bestimmung der DNA -Konzentration	35

2.12.1. Spektralphotometrie	35
2.12.2. Spektralphotometrie unter Verwendung des Gene Quant II	36
2.12.3. Agarosegelelektrophorese	36
2.13. Enzymatische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	37
2.14. Agarosegelelektrophorese und Dokumentation der Gele	37
2.14.1. Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese	37
2.14.2. Aufnahme von Agarosegelen unter Verwendung einer Geldokumentationsanlage	38
2.15. Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	38
2.16. Ligation	39
2.17. Nichtradioaktive Markierung von DNA mit Digoxigenin	39
2.18. Southern Blotting.....	40
2.18.1. Übertragung der DNA auf eine Nylonmembran mittels Vakuumblotting	40
2.18.2. DNA-DNA Hybridisierung.....	41
2.18.3. Kartierung des Genoms von <i>B. japonicum</i>	42
2.19. Herstellung kompetenter Zellen.....	43
2.19.1. Calciumchlorid kompetente Zellen.....	43
2.19.2. elektrokompetente Zellen.....	44
2.20. Transformation.....	45
2.20.1. Transformation Calciumchlorid kompetenter Zellen	45
2.20.2. Transformation elektrokompetenter Zellen (Elektroporation)	45
2.21. Konjugation.....	46
2.22. Sequenzierung	46
2.22.1. Sequenzierreaktion mit Hilfe der PCR	46
2.22.2. Herstellung des Polyacrylamidgels für die elektrophoretische Auftrennung	48
2.22.3. Polyacrylamid Gelelektrophorese unter Verwendung des LI-COR DNA Sequencers	49
2.22.4. Auswertung der Sequenzdaten	49
2.23. Vektorintegrationsmutagenese	50
2.24. Reportergenfusion	50
2.24.1. Verwendung von <i>lacZ</i> als Reportergen	50
2.24.2. Verwendung von <i>phoA</i> als Reportergen	51
2.25. Messung der Expression von Reportergenfusionen in Bakterien Kulturen.....	52
2.25.1. <i>In vitro</i> Messung der β -Galactosidase Aktivität von Flüssigkulturen	52
2.25.2. <i>In vivo</i> Messung der β -Galactosidase Aktivität in <i>E. coli</i> Flüssigkulturen	53
2.25.3. <i>In vitro</i> Messung der alkalischen Phosphatase Aktivität	54
2.25.4. Optische Differenzierung der Reportergenexpression von Bakterienkolonien auf Agarplatten ..	54
2.26. Überexprimierung von potentiellen Genen	
mit Hilfe des QIAGEN Expressions Systems	55
2.27. Inkorporation von radioaktivem [⁷⁵Se]-Selenit in wachsende Bakterienkulturen.....	55
2.28. Isolierung und	
Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine aus Bakterienkulturen.....	56
2.28.1. Ernte, Aufschluß der Bakterienzellen und Probenvorbereitung	56

2.28.2. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS -PAGE) des Proteoms	57
2.28.3. Dokumentation des Polyacrylamidgels	58
2.29. Isolierung und Analyse der EPS von <i>B. japonicum</i>	59
2.29.1. Anzucht der Bakterien	59
2.29.2. Gewinnung und Reinigung von bakteriellen EPS	59
2.29.3. Analyse der Polysaccharidbestandteile mittels HPLC	60
2.30. Beobachtung und Dokumentation mit Hilfe mikroskopischer Methoden	60
2.30.1. Einbettung von Knöllchengewebe und Herstellung von Dünnschnitten	60
2.30.2. Kontrastierung der Schnitte für die Elektronenmikroskopie	61
2.30.3. Mikroskopie	62
2.30.4. Photographie und Bearbeitung mikroskopischer Bilder	62
3. ERGEBNISSE	63
3.1. Verifizierung und Lokalisierung	
der <i>TnphoA</i> Insertion im Genom der Mutante <i>B. japonicum</i> 2-10	63
3.2. <i>B. japonicum</i> 2-10 ist in der Symbiose mit <i>Glycine max</i> stark beeinträchtigt	64
3.2.1. Die Phänotypen der Pflanzen in der Symbiose	64
3.2.2. Die N ₂ -Fixierungsleistung der Knöllchen	66
3.2.3. Licht- und elektronenmikroskopische Analyse der Knöllchen	66
3.3. Der Phänotyp von <i>B. japonicum</i> 2-10 unter freilebenden Bedingungen.....	71
3.3.1. Das Wachstum von <i>B. japonicum</i> 2-10 auf Agarplatten	71
3.3.2. Das Wachstum von <i>B. japonicum</i> 2-10 in Flüssigkultur	72
3.3.3. Die Größe der Zellen von <i>B. japonicum</i> 2-10 in Flüssigkultur	75
3.3.4. HPLC-Analyse der Exopolysaccharide	77
3.3.5. Vergleich des Gesamtproteins mittels eindimensionaler SDS -PAGE.....	79
3.3.6. Das Wachstum und die N ₂ -Fixierung bei Anzucht in High K ⁺ Medium	80
3.4. Isolierung und Sequenz Analyse der	
mutierten DNA -Region im Genom von <i>B. japonicum</i> 110^{spc4}	81
3.4.1. Klonierung der die <i>TnphoA</i> Insertion umgebenden DNA-Fragmente	82
3.4.2. Physikalische Kartierung mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen.....	82
3.4.3. Subklonierung und Synthese von DNA-Fragmenten mittels PCR.....	83
3.4.4. Die Nukleotid-Sequenz eines 6,7 kb großen DNA-Bereiches	
und die daraus abgeleitete AS-Sequenz der vorhandenen ORFs.....	84
3.4.5. Computergestützte Analyse der abgeleiteten Aminosäure Sequenzen	95
3.4.6. Lokalisierung der DNA-Region im Genom von <i>B. japonicum</i> 110	99
3.5. <i>intA</i> ist essentiell für eine effektive Symbiose mit <i>Glycine max</i> bv. Maple Arrow.....	100
3.5.1. Konstruktion definierter Mutationen in <i>intA</i> durch VIM	100
3.5.2. Die Phänotypen der Pflanzen in der Symbiose	101
3.5.3. Die N ₂ -Fixierungsleistung der Knöllchen	103
3.5.4. Licht- und elektronenmikroskopische Analyse der Knöllchen.....	104

3.6. Vektorintegrationsmutagenese in	
<i>B. japonicum</i> 110spc4 und Komplementationsversuche in <i>B. japonicum</i> 2-10	108
3.6.1. Konstruktion definierter Mutanten durch VIM und Komplementation	108
3.6.2. Die Phänotypen der Pflanzen in der Symbiose	111
3.6.3. Die N ₂ -Fixierungsleistung der Knöllchen	112
3.6.4. Licht- und elektronenmikroskopische Analyse der Knöllchen	113
3.7. Besonderheiten des potentiellen Genproduktes der ORFs <i>ub1</i> und <i>ub2</i>	129
3.7.1. Die DNA-Sequenz und die daraus abgeleitete AS Sequenz	130
3.7.2. Reportergenfusion downstream des UGA Codons von <i>ub1</i>	133
3.7.3. Expression eines gemeinsamen Genproduktes Ub12 der ORFs <i>ub1</i> und <i>ub2</i> in <i>E. coli</i>	135
3.8. Vorkommen und Relevanz von Selen und Selenocystein	
in <i>B. japonicum</i> 110spc4, sowie ihr cotranslationaler Einbau in Proteine	137
3.8.1. Identifizierung eines DNA-Bereiches in <i>B. japonicum</i> 110spc4 mit Sequenzähnlichkeit mit der Selenocystein-Synthase <i>selA</i>	137
3.8.2. Die Unterbrechung des ORFs <i>sbp</i> beeinträchtigt die Symbiose mit <i>Glycine max</i> bv. Maple Arrow	139
3.8.3. Potentielle stem-loop Strukturen in der mRNA von <i>ub12</i>	144
3.8.4. Der Versuch des cotranslationalen [⁷⁵ Se]-Einbaus in Ub12 in <i>E. coli</i>	147
3.8.5. Inkorporation von [⁷⁵ Se] in das Proteom von <i>B. japonicum</i> 110spc4	148
3.9. Reportergenfusionen belegen das Überlesen des UGA Codons	
in <i>E. coli</i>, in Abhängigkeit vom downstream Bereich der mRNA	150
3.9.1. Konstruktion translationaler <i>lacZ</i> -Reportergenfusionen mittels PCR	150
3.9.2. Die Expression einer funktionellen β-Galactosidase in <i>E. coli</i> ATG-8	154
3.9.3. Messung der β-Galactosidase Aktivität der RGF Klone in <i>E. coli</i>	155
4. DISKUSSION	157
4.1. Die <i>TnphoA</i>-Insertion in <i>B. japonicum</i> 2-10	
beeinflußt das Wachstum und die Entwicklung der Bakterien	157
4.1.1. Die phänotypischen Besonderheiten von <i>B. japonicum</i> 2-10 in Reinkultur	157
4.1.2. Die Defizite von <i>B. japonicum</i> 2-10 in der symbiotischen Interaktion mit <i>Glycine max</i> bv. Maple Arrow	161
4.1.3. Die <i>TnphoA</i> -Insertion ist partiell komplementierbar	164
4.2. Die ORFs im Bereich der <i>TnphoA</i>-Insertion von <i>B. japonicum</i> 2-10	
zählen zur Gruppe der <i>house-keeping</i> Gene	165
4.2.1. <i>ub12</i> , symbiotische Relevanz und Expression in <i>B. japonicum</i> 110spc4	166
4.2.2. Die Auswirkungen der gerichteten Mutagenese der ORFs <i>ub4</i> und <i>ub5</i>	169
4.2.3. Das symbioserelevante Gen <i>intA</i> in <i>B. japonicum</i> 110spc4	170
4.2.4. Die genetische Organisation in der untersuchten DNA-Region	172
4.2.5. Die Topologie der abgeleiteten Genprodukte	173
4.3. Der Einfluß von Selen auf die Entwicklung von <i>B. japonicum</i> 110spc4	174
4.3.1. Das Wachstum von <i>B. japonicum</i> 110spc4 und <i>B. japonicum</i> 2-10	176

4.3.2. Der Selenocystein Biosyntheseapparat in Rhizobien	177
4.3.3. Das potentielle Selen bindende Protein Sbp scheint symbioserelevant.....	177
4.3.4. Die unspezifische Inkorporation von Selen in <i>B. japonicum</i> 110 <i>spc4</i>	178
4.4. Das Überlesen des TGA Codons von <i>ub12</i> in <i>E. coli</i>	
deutet auf eine cotranslationale Insertion von Selenocystein hin	180
4.4.1. Ausschluß anderer Mechnismen der TGA Suppression	
aufgrund der Gegebenheiten in <i>B. japonicum</i> 110 <i>spc4</i>	180
4.4.2. Die Besonderheiten der downstream Region deuten auf eine Sekundärstruktur hin	182
4.4.3. Die Relevanz des downstream Bereiches für das Überlesen von TGA	184
4.5. Ausblick.....	187
4.5.1. Die Mutante <i>B. japonicum</i> 2-10	188
4.5.2. Funktion und Wirkung von Selen in <i>B. japonicum</i> 110 <i>spc4</i>	188
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	190
6. LITERATURVERZEICHNIS	193

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Ampere
AB	Antibiotikum
A. bidest.	Aqua bidestillata (bidestilliertes Wasser)
AB ^r	resistent (gegen dieses Antibiotikum)
AB ^s	sensitiv (gegenüber diesem Antibiotikum)
Abs	Absorption
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
<i>B.</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bv.	Sorte (biovar)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cfu	koloniebildende Einheiten (colony forming units)
Cm	Chloramphenicol
C-Terminus	Carboxy-terminaler Bereich eines Proteins
Cys	Cystein
d	Tage (days)
Da	Dalton
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat (N = G, A, T oder C)
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat (N = G, A, T oder C)
ds	Doppelstrang (double strand)
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung; $9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ (bei Zentrifugationen)
G	Guanin
Gm	Gentamycin
h	Stunde (hour)
i	Inosin
IPTG	1-Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
Km	Kanamycin
l	Liter
<i>lacZ</i>	Gen, das für das Enzym β -Galactosidase kodiert
$\text{'}lacZ$	das Gen liegt promotorlos vor
λ -DNA	DNA des Phagen Lambda
Lsg.	Lösung
LZZ	Lebendzellzahl
m	Meter
M	$\text{Mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Met	Methionin
min	Minute
<i>mob</i>	Mobilitätsgen
mRNA	messenger RNA
NBT	Nitroblau Tetrazolium Chlorid
N-terminal	Amino-terminaler Bereich eines Proteins
OD _{xxx}	optische Dichte; xxx = Wellenlänge in Nanometer
ONPG	2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
<i>ori</i>	origin of replication
PAG	Polyacrylamid Gel
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
pBs	pBluescript® II KS+
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

<i>phoA</i>	Gen, das für das Enzym alkalische Phosphatase kodiert
<i>R.</i>	<i>Rhizobium</i>
Rg	Reagenzglas
RGF	Reportergenfusion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per min)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
sp.	Spezies (nicht näher definierte Art einer Gattung)
Spc	Spectinomycin
ss	Einzelstrang (single strand)
T	Thymin
Tc	Tetracyclin
Tn	Transposon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Einheit der Enzymaktivität)
U	Uracil
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
v	Volumen
V	Volt
VIM	Vektorintegrationsmutagenese
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen (weight per volume)
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid
X-Phosphat	5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphat Toluidinium Salz

Die verwendeten chemischen Formeln, Symbole und Einheiten gehen konform mit den internationalen Standards.

1. Einleitung

Die Symbiose ist eine auf der Erde weit verbreitete Strategie, die von Organismen genutzt wird, um ihre Fitness zu erhöhen. In einer Symbiose ziehen die beteiligten Partner unterschiedlicher Spezies einen Nutzen aus der engen Beziehung, in der sie leben und den Fähigkeiten der anderen Art. Die Symbiose stellt damit eine Optimierung des Überlebens und der Weiterentwicklung im Laufe der Evolution dar.

Der Begriff der Symbiose (Mutualismus) wurde bereits 1879 von dem Botaniker De Bary eingeführt. Diese Form der interartlichen Beziehung unterscheidet sich von dem Kommensalismus, bei dem nur einer der Partner einen Nutzen hat, ohne den anderen Partner zu beeinflussen, und dem Parasitismus (Antagonismus), bei dem einer der Partner einen Nutzen aus der Beziehung zieht, während der andere dabei geschädigt wird (Werner, 1992).

Die Entstehung einer Symbiose im Laufe der Evolution bzw. Co-Evolution der Organismen kann auf verschiedenen Wegen erfolgen.

So kann eine Symbiose aus einem Räuber-Beute Verhältnis hervorgehen, wie dies beispielsweise in der Endosymbiontentheorie vermutet wird (Schimper, 1883). Es wird vermutet, daß Prokaryoten von einem einfachen Eukaryoten phagocytiert aber nicht über Lysosomen verdaut, sondern im Cytoplasma des Eukaryoten domestiziert wurden. Die entstandene Endosymbiose kann sich weiterentwickeln und der Mikrosymbiont kann zu einem festen organellartigen Bestandteil der Zelle werden. Diese Entwicklungsgeschichte wird für die Zellorganellen der Eukaryoten angenommen (Altmann, 1890; Emelyanov, 2001). Auch für den indirekten Weg zu einer solchen Endosymbiose sind Beispiele beschrieben, in diesen Fällen wurde anstatt eines Prokaryoten ein anderer Eukaryot durch einen Eukaryoten phagocytiert und die Organellen des Endosymbionten wurden in die Stoffwechselwege des Makrosymbionten mit einbezogen (Maier *et al.*, 1991; McFadden *et al.*, 1994; Van De Peer *et al.*, 1996).

Der Signalaustausch, der bis zur Ausbildung der Symbiose zwischen den Partnern stattgefunden hat, ist nachträglich kaum zu rekonstruieren. Man kann davon ausgehen, daß die zusätzlichen Stoffwechselfähigkeiten des Endosymbionten in jedem Fall ein wichtiger Faktor waren (Margulis, 1981).

Weitere wichtige Signale in der Ausbildung einer Endosymbiose sind biochemische Faktoren, wie sie beispielsweise in der rezenten Endosymbiose zwischen dem Süßwasserpolyphen *Hydra viridis* und Grünalgen der Gattung *Chlorella* identifiziert wurden, bei der sowohl unterschiedliche Zelloberflächenstrukturen der Mikrovilli des Makrosymbionten als auch Zellwandstrukturen des Mikrosymbionten für eine erfolgreiche Endocytose essentiell sind (Reisser, 1990).

Darüberhinaus gibt es eine Vielzahl von äußeren Faktoren, die die Fitness der beteiligten Partner und die Ausbildung einer Endosymbiose zwischen Bodenbakterien und Pflanzen beeinflussen können. Das Wachstum der Bodenbakterien beispielsweise ist von Faktoren wie Osmolarität, pH-Wert und präsenten Antibiotika abhängig (Raza *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001). Auf eine effektive Besiedlung der Pflanzenwurzel können Krankheitserreger, Düngung der pflanzlichen oder auch der bakteriellen Partner, potentiell gefährliche organische Chemikalien wie auch Veränderungen in der Rhizosphären-Kompetenz negative Auswirkungen haben (Lugtenberg *et al.*, 1999; Lugtenberg *et al.*, 2001).

Um eine Endosymbiose ausbilden zu können, muß der Mikrosymbiont also entweder aktiv aufgenommen werden oder zu einer effektiven Invasion des Makrosymbionten befähigt sein. Ein weiterer möglicher Weg der Entwicklung führt demzufolge über den Parasitismus. Eine effektive Infektion durch den Parasiten kann in einer Endosymbiose resultieren, wenn der Wirt in der Lage ist, Vorteile aus dem Verhältnis der beteiligten Partner zu ziehen.

Diese Entstehungsgeschichte wird für die in dieser Arbeit untersuchte Symbiose postuliert, die Beziehung von höheren Pflanzen aus der Ordnung der Fabales (weiterer gebräuchlicher Name: Leguminosen) mit Bakterien der Gattungen *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* und *Bradyrhizobium* aus der Familie der Rhizobiaceae.

In der Ausbildung der Endosymbiose ist eine Vielzahl an Vorgängen und Faktoren zu erkennen, die mit einer parasitischen Infektion des pflanzlichen Partners übereinstimmen. Als Beispiele sollte das Eindringen der Bakterien in die Pflanze und die rudimentär erkennbare Abwehrreaktion der Pflanze genannt werden (Baron *et al.*, 1995; Hutcheson, 1998; Crockard *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2001). Darüberhinaus kommt es zu einer Veränderung des pflanzlichen Metabolismus und der Morphologie. Beispielhaft anzusprechen sind die Gene *Mt-phan*, *Mt-knox-1*, *ccs52* und ENOD40 im Genom von

Fabaceen, deren spezifische Expression essentielle Elemente der Wirtantwort auf parasitische wie auch auf mutualistische Infektionen darstellen kann (Kouchi *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1993; Crespi *et al.*, 1994; Van Rhijn *et al.*, 1997; Flemetakis *et al.*, 2000; Koltai *et al.*, 2001). Nach einer erfolgreichen parasitischen Infektion kommt es oft zur Bildung von Tumoren (Yajko *et al.*, 1971; Bölker, 2001), im Fall der Fabales-Rhizobien-Symbiose zur Ausbildung von Wurzel- und Stammknöllchen (Vance, 1983; Werner, 1992).

Die mögliche Degenerierung des symbiotischen Verhältnisses zu einer klassischen parasitischen Interaktion, durch Veränderungen in den Lebensbedingungen oder dem Genom der beteiligten Partner, wird als ein weiteres entscheidendes Indiz für die Entstehung dieser Symbiose aus einem parasitischen Verhältnis angesehen (Vance, 1983).

Die Rhizobien gehören zur Gruppe der α Proteobakterien. Bei den Gattungen *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* und *Bradyrhizobium* handelt es sich um Gram-negative Bodenbakterien die sich chemoorganotroph oder chemolithotroph obligat aerob ernähren können.

Die Taxonomie der Arten und Unterarten basiert vorwiegend auf ihrem Wirtsspektrum, während molekularbiologische Methoden, wie Sequenzierung und Vergleich der 16S rRNA oder RFLP (Restriktions Fragment Längen Polymorphismus), seit einigen Jahren verstärkt in der Analyse der phylogenetischen Zusammenhänge eingesetzt werden und diese konkretisieren (Yanagi *et al.*, 1993; Laguerre *et al.*, 2001).

Aufgrund ihrer komplexen Stoffwechselfähigkeiten sind die Rhizobien in der Lage, sehr verschiedene Lebensräume zu besiedeln. Sie können sich als freilebende Bodenbakterien durchsetzen, in der Rhizosphäre von Pflanzenwurzeln ansiedeln und als Endosymbionten die Zellen von Pflanzen besiedeln (Abb.01).

Der Begriff der Rhizosphäre wurde 1904 von Hiltner eingeführt, sie stellt für die Rhizobien den Grenzbereich zwischen freilebender und endosymbiotischer Lebensweise dar. Die Rhizosphäre zeichnet sich, im Vergleich zum wurzelfreien Boden, durch einen hohen Nährstoff-Gehalt aus, der aus den Wurzel-Exsudaten der Pflanzen (organische Säuren, Zucker, Aminosäuren, etc.) resultiert; Milben, Nematoden und Mikroorganismen finden sich dort in erhöhtem Titer (Bazin *et al.*, 1990).

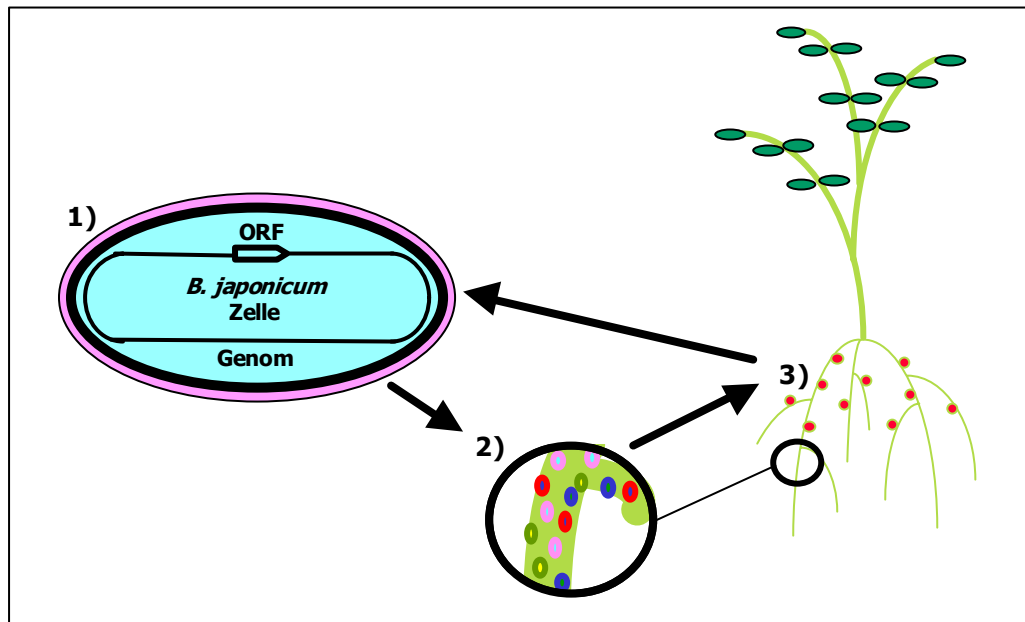


Abb.01 (Steele und Becker): *Bradyrhizobium japonicum* ist in der Lage sich in verschiedenen Lebensräume durchzusetzen. Frei lebend als Bodenmikroorganismus mit der Möglichkeit zu heterotrophem und autotrophem Wachstum (1), in der Rhizosphäre mit der verstärkten Konkurrenz durch einen hohen Titer anderer Mikroorganismen (2) und als Endosymbiont im Knöllchen der Wurzel von *Glycine max* (3).

Das in Amerika beheimatete Bodenbakterium *Bradyrhizobium japonicum* bildet eine sehr effektive Symbiose mit der ursprünglich aus China stammenden Sojabohne *Glycine max* aus.

Es handelt sich bei *Glycine max* um die domestizierte Form von *Glycine soja*. Die 2835 vor Christus erstmals in einem chinesischen Text erwähnte Sojabohne gehört zu der Familie der Fabaceae, aus der Ordnung der Fabales. Die Sojabohne bietet weitreichende Nutzungsmöglichkeiten, wie die Produktion verschiedenster Nahrungsmittel, biologisch abbaubarer Kunststoffe, Farben und Lacke, verspinnter Fasern und vielem mehr. Ihre Früchte sind sowohl reich an Protein (34 %) als auch an Fett (18 %) (Trueb, 1999). Laut Angaben der FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) betrug die Sojabohnenernte im Jahr 2000 über 160 Millionen Tonnen weltweit, und sie gehört damit, bei ca. 73 Millionen Hektar Anbaufläche, zu den wichtigsten Weltwirtschaftspflanzen (weitere Informationen, Daten und Verweise über die homepage des International Institute of Tropical Agriculture: <http://www.iita.org/crop/soybean.htm>).

Bei dem in unseren Versuchen eingesetzten WT Stamm *Bradyrhizobium japonicum* 110*spr4* (Regensburger *et al.*, 1983) handelt sich um ein Spectinomycin resistentes Derivat des Stammes 3I1b110 vom US Department of Agriculture (USDA) in Beltsville

(USA). Die herausragende Fähigkeit des Mikrosymbionten *Bradyrhizobium japonicum* (die heutige Bezeichnung der früher als *Rhizobium japonicum* geführten Art [Jordan, 1982]) und der gesamten Gruppe der Rhizobien ist die Möglichkeit, atmosphärischen Stickstoff zu Ammoniak zu reduzieren und damit molekularen Stickstoff in einer für Stoffwechselvorgänge nutzbaren Form zu binden (Fixierung). Sie machen dadurch Stickstoff, einen limitierenden Faktor für das Pflanzenwachstum, für den Makrosymbionten über die Assimilation nutzbar (Hellriegel *et al.*, 1888; Van Rhijn *et al.*, 1995).

Die in unseren Versuchen eingesetzte Sorte der Sojabohne *Glycine max* bv. Maple Arrow (wie auch die anderen Sorten dieser Art) ist für ein optimales Wachstum auf die Symbiose mit dem bakteriellen Partner angewiesen, wenn kein gebundener Stickstoff zugegeben wird. Die Auswirkungen der Unterversorgung und die Relevanz von Stickstoff für das Wachstum der Pflanzen zeigen sich bereits 30 d nach dem Ankeimen der Samen (Abb.02). Als Gegenleistung versorgt die Sojabohne die Mikrosymbionten mit Kohlenstoffverbindungen und Energiequellen aus der photosynthetischen Kohlenstofffixierung (West *et al.*, 2002).

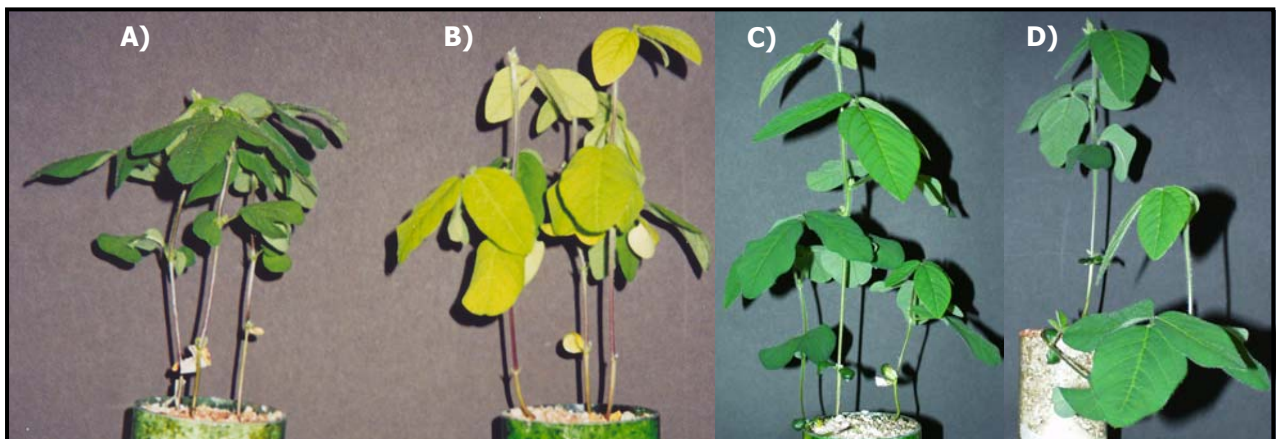


Abb.02: Photographische Dokumentation der Sojabohne *Glycine max* bv. Maple Arrow 30 d nach dem Ankeimen.

- A) Wenn die Keimlinge mit *Bradyrhizobium japonicum* 110spc4 inokuliert werden bildet sich die Pflanze uneingeschränkt aus.
- B) Ohne Mikrosymbionten weist die Pflanze schwere Chlorosen und ein verringertes Wachstum der Früchte auf, wenn kein gebundener Stickstoff im Nährmedium vorhanden ist.
- C) Die Ausbildung von Chlorosen kann durch die Zugabe von 7,5 mM KNO_3 zu der Leguminosennährlösung verhindert werden.
- D) Eine Inokulation mit *Bradyrhizobium japonicum* 110spc4 bewirkt keine zusätzlichen Veränderungen im Pflanzenwachstum bei Anzucht in der Nitrat-haltigen Leguminosennährlösung.

Die erfolgreiche Ausbildung der Symbiose zwischen Rhizobien und Leguminosen wird durch einen gut koordinierten Signalaustausch der beteiligten Partner ermöglicht, der zu Beginn der Interaktion das gegenseitige Erkennen ermöglicht (Djordjevic *et al.*, 1987; Brewin, 1991; Verma, 1992; Spaink, 2000). Die Signale sind sehr spezifisch, bei den resultierenden Symbiosen sind allerdings sowohl solche mit einem sehr engen als auch solche mit einem sehr breiten Partnerspektrum bekannt (Werner, 1992).

Die ersten nachgewiesenen Signale in der Informations-Kaskade sind die in dem Wurzelexsudat durch die Leguminosen abgegebenen Flavonoide (Phillips *et al.*, 1996), in der Symbiose mit *Bradyrhizobium japonicum* handelt es sich um die Isoflavone Genistein und Daidzein (Kosslak *et al.*, 1987). Ihr Rezeptor auf bakterieller Seite ist NodD, das die Flavonoide spezifisch bindet (Mulligan *et al.*, 1985; Györgypal *et al.*, 1988; Goethals *et al.*, 1992), durch die Interaktion wird es aktiviert und wirkt in dieser Form als Transkriptionsaktivator der anderen *nod* Gene (Fisher *et al.*, 1992). Die Expression von *nolA* und *nodD*, wie auch die vollständige Expression des *nodYABC* Operons, wird ihrerseits über die Response-Regulatoren NwsB und NodW reguliert (Loh *et al.*, 2002). Die Kontrolle der Expression von *NolA* und *NodD2* erfolgt auch über die Konzentration vorhandener Chitin und Lipochitin Oligomere und beeinflusst so, auf dem Wege einer *feedback* Regulation, die Expression des *nodYABC* Operons (Loh *et al.*, 2001).

Die Expression der *nod* Gene im Genom der Rhizobien resultiert in der Synthese der Nod-Faktoren, sie spielen eine Schlüsselrolle in dieser frühen Erkennungsphase. Es handelt sich um Lipo-Oligosaccharide mit einem Grundgerüst aus N-Acetylglukosamin-Resten, das in unterschiedlicher Weise substituiert vorliegt (Fisher *et al.*, 1992; Spaink, 1992; Denarie *et al.*, 1993; Carlson *et al.*, 1995). Die *nod* Genotypen haben eine Co-Evolution mit der Diversität der Wirtspflanzen durchlaufen, im Gegensatz zu den Rhizobien selbst, die einer anderen Evolution gefolgt sind (Mergaert *et al.*, 1997). Ein horizontaler Transfer symbioserelevanter Gene spielt dabei eine entscheidende Rolle für die Diversität symbiotisch aktiver Stämme (Sullivan *et al.*, 1995), wobei dieser horizontale Transfer symbioserelevanter Genom-Regionen durch phagenverwandte Integrasen katalysiert wird (Sullivan *et al.*, 1998), Enzyme, die auch in anderen symbiotischen Vorgängen eine entscheidende Rolle spielen können, wie beispielsweise der Besiedlung von Pflanzenwurzeln (Dekkers *et al.*, 1998).

Die chemische Zusammensetzung des Nod-Faktors von *Bradyrhizobium japonicum* ist insofern einzigartig, als daß ein zusätzlicher Zucker, 2-*O*-Methylfucose, an das reduzierende Ende des Pentasaccharides gebunden ist (Sanjuan *et al.*, 1992).

Die Nod-Faktoren sind bereits in pico- bis nanomolaren Konzentrationen wirksam und setzen durch die Interaktion mit dem Rezeptor auf pflanzlicher Seite eine Nod-Faktor induzierte Signal Kaskade in Gang (Lerouge *et al.*, 1990; D'Haeze *et al.*, 2002). Zu den charakteristischen direkt Nod-Faktor induzierten Reaktionen der Leguminosen in der frühen Interaktion gehört die Wurzelhaareinkrümmung (Lerouge *et al.*, 1990; Roche *et al.*, 1991). Sie kann bereits durch 10 minütige Inkubation mit dem Nod-Faktor ausgelöst werden (Heidstra *et al.*, 1994) und geht mit einer Reihe physiologischer Reaktionen in der Cytoplasmamembran und dem Cytoplasma einher (Ehrhardt *et al.*, 1992; Allen *et al.*, 1994; Heidstra *et al.*, 1994), sowie der Remeristematisierung bereits differenzierter Cortexzellen (Truchet *et al.*, 1991), der Ausbildung von Prä-Infektionsschlauch Strukturen (Van Brussel *et al.*, 1992) und der Expression bestimmter symbiosespezifischer Gene der Pflanze (Nap *et al.*, 1990; Horvath *et al.*, 1993; Journet *et al.*, 1994). Es bleibt zu beachten, daß diese Vorgänge nicht vollständig einheitlich ablaufen, sondern, abhängig von der Pflanzenspezies, Unterschiede auftreten können.

Ein folgender Schritt in der Entwicklung dieser Endosymbiose ist die Anheftung der Bakterienzellen an die Wurzelhaare der Pflanze. Involvierte Faktoren sind unter anderem Zellulosefibrillen und Ca^{2+} -abhängige Adhesine des Mikrosymbionten (Smit *et al.*, 1987; Kadreva *et al.*, 1995), spezifische zuckerbindende Lektine der Wurzelhaaroberfläche (Bhuvaneswari *et al.*, 1977; Dazzo *et al.*, 1978; Diaz *et al.*, 1995) sowie die rhizobiellen Oberflächenpolysaccharide (Kato *et al.*, 1980; Eggleston *et al.*, 1996; Perret *et al.*, 2000). Die beteiligten Polysaccharide der Rhizobien sind die Lipopolysaccharide (LPS), die Exopolysaccharide (EPS), die KDO-Polysaccharide und die zyklischen β -Glukane. Sie sind in dieser Phase der Symbiose nicht nur für die rein mechanische Anheftung sondern auch für die Erkennung der Partner und den anschließenden Infektionsprozeß von Bedeutung (Müller *et al.*, 1988; Parniske *et al.*, 1994; Eggleston *et al.*, 1996; Becker *et al.*, 1998; Perret *et al.*, 2000; Mithofer *et al.*, 2001).

Nach der Anheftung der Rhizobien an die Wurzelhaarspitze erfolgt das Einrollen des Wurzelhaares und das Eindringen der Bakterien in die Pflanze über eine lokale Hydrolyse der Pflanzenzellwand (Callaham *et al.*, 1981; Van Spronsen *et al.*, 1994). Die Mikrosymbionten gelangen durch den Infektionsschlauch in die Knöllchenprimordien, die durch die Nod-Faktor induzierte lokale mitotische Teilungsaktivität der Wurzelrindenzellen

vom Makrosymbionten ausgebildet wurden. Dort werden sie, beim Eindringen in das Cytoplasma der Pflanzenzellen, von der Peribakteroidenmembran (PBM) umgeben (Verma *et al.*, 1978; Whitehead *et al.*, 1997).

In der weiteren Ausbildung der Symbiose kommt es sowohl auf pflanzlicher als auch auf bakterieller Seite zu morphologischen und physiologischen Veränderungen.

So wachsen die Knöllchenprimordien zu Wurzelknöllchen aus, es handelt sich dabei um neue Pflanzenorgane, verantwortlich für das Knöllchenwachstum ist das *nin* Gen (Spaink, 1999). Die Wurzelknöllchen wachsen je nach Pflanze determiniert oder undeterminiert, es konnte allerdings beobachtet werden, daß bei *Sesbania rostrata* beispielsweise die Umweltbedingungen einen Wechsel von determinierten zu undeterminierten Knöllchen verursachen können, kontrolliert durch das Pflanzenhormon Ethen (Fernandez-Lopez *et al.*, 1998).

Die Bakterien andererseits differenzieren zu den Bakteroiden, von denen je nach Pflanzenspezies und Knöllchenalter 1-20 von einer PBM umgeben sind (Werner, 1992; Whitehead *et al.*, 1997). Die Bakteroiden, die umgebende PBM und der dazwischen liegende Peribakteroidenraum werden zusammen als Symbiosom bezeichnet (Roth *et al.*, 1989), wobei das Symbiosom als gemeinsame funktionelle Einheit der verschiedenen pflanzlichen Endosymbiosen angesehen wird (Parniske, 2000). An der Entwicklung vom Bakterium zum Bakteroid sind eine Vielzahl von Genen beteiligt (Oke *et al.*, 1999), solche deren Genprodukte direkt in die Differenzierung eingreifen (Glazebrook *et al.*, 1993; Ichige *et al.*, 1997) wie auch Gene deren Genprodukte relevante Proteine prozessieren, z.B. Signalpeptidasen (Müller *et al.*, 1995). Die ausdifferenzierten Bakterioide exprimieren, unter den im Wurzelknöllchen herrschenden Umweltbedingungen, eine aktive Nitrogenase, das Enzym, das sie zur Reduktion von molekularem Stickstoff befähigt, der dann in Form von Ammoniak an den Makrosymbionten abgegeben wird (Hellriegel *et al.*, 1888; Van Rhijn *et al.*, 1995).

Das von den Rhizobien synthetisierte NH_4^+ ist darüberhinaus ein wichtiger Regulator in der Symbiose mit den Leguminosen, sowohl in der Form des Ammoniak als auch nach Bindung in organischen Komponenten (Patriarca *et al.*, 2002).

In der Ausbildung der Symbiose zwischen *Glycine max* und *Bradyrhizobium japonicum* spielen demnach unter anderem diejenigen Faktoren eine große Rolle, die sich an der Außenseite der Bakterienzelle befinden bzw. von ihr sekretiert werden, wie EPS und periplasmatische Proteine.

Die von uns gewählte Methode zur Identifizierung solcher sekretierter Proteine war die ungerichtete Mutagenese mit dem Transposon *Tn_{phoA}* (Manoil *et al.*, 1985). Dieses Konstrukt basiert auf dem Transposon Tn5 (Reznikoff, 1993) und trägt zusätzlich in der linken Insertionssequenz das um seine N-terminale Signalsequenz verkürzte Gen der alkalischen Phosphatase. Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase kann nur detektiert werden, wenn das Reportergen *phoA* durch die Transposition *in frame* in den Bereich eines Genes integriert ist, der eine periplasmatische Domäne oder ein exoplasmatisches Protein kodiert, resultierend in einem Hybridprotein, das aus dem Cytoplasma der Bakterienzelle geschleust wird (Manoil *et al.*, 1986).

Durch eine solche ungerichtete *Tn_{phoA}* Mutagenese von *B. japonicum* 110*spc4* wurde *B. japonicum* 2-10 erzeugt, die Mutante, deren Analyse die Grundlage dieser Arbeit bildet. Das gerichtete Ausschalten von Genen erfolgte daraufhin durch Vektorintegrationsmutagenese über einfache Rekombination und erlaubte so die genauere Untersuchung der genotypischen und phänotypischen Zusammenhänge.

Bei der Analyse der DNA-Sequenz können Besonderheiten auftreten, die genauerer Untersuchung bedürfen. So kann ein TGA Codon, das nach der für Rhizobien angenommenen *codon usage* ein Stoppcodon der Translation codiert (Gouy *et al.*, 1982; Ramseier *et al.*, 1991), in der Expression auch überlesen (unterdrückt) werden, wobei dies durch verschiedene bekannte Mechanismen erfolgen kann.

So kann anstelle eines Translationsstopps an einem UGA in der mRNA der Einbau der Aminosäure Tryptophan erfolgen, dies ist aber anscheinend direkt abhängig von dem Kontext in der mRNA (Miller *et al.*, 1983). Ein Adenin in der Basenabfolge der mRNA, das in 3'-Richtung auf das UGA folgt wird als essentiell angesehen (Engelberg-Kulka, 1981). Weitere Untersuchungen zeigen, daß die UGA-Unterdrückung (Suppression) auch auf einer einzelnen fehlenden Methylierung der tRNA beruhen kann, hervorgerufen durch das Fehlen einer bestimmten tRNA Methylase Aktivität (Reeves *et al.*, 1975).

Ein indirektes Überlesen des UGA Codons kann andererseits auch durch einen upstream auftretenden frameshift bei der Translation erfolgen. Es kommt zu einem ribosomalen Sprung in einen anderen Leserahmen an sogenannten „hungrigen Codonen“, das Stoppcodon wird somit praktisch umfahren (Weiss *et al.*, 1988)

Ein anderer bekannter Mechanismus, der ein ähnliches Umgehen eines Stopcodons bewirkt, ist die posttranslationale Kopplung kotranslatierter Genprodukte, die daraufhin als Einheit aus dem Cytoplasma exportiert werden (Sargent *et al.*, 1998; Gross *et al.*,

1999). Charakteristisch und essentiell für diesen Mechanismus, der in erster Linie als Sec-unabhängiger Weg der Translokation gefalteter Proteine identifiziert wurde, ist ein sogenanntes Twin Arginin Motiv (Chaddock *et al.*, 1995; Santini *et al.*, 1998; DeLisa *et al.*, 2002).

Das Codon UGA kann allerdings auch die Aminosäure Selenocystein kodieren (Böck *et al.*, 1991), Voraussetzung dafür ist eine stem-loop Struktur in der mRNA, die je nach Organismen-Gruppe unterschiedlich lokalisiert ist (Low *et al.*, 1996; Hüttenhofer *et al.*, 1998; Rother *et al.*, 2001). In Bakterien tritt die stem-loop Struktur direkt downstream des UGA auf und wird über den spezifischen Translationsfaktor SelB erkannt. Es kommt zur Ausbildung eines quartären Komplexes, die im cotranslationalen Einbau der 21ten Aminosäure Selenocystein resultiert (Hüttenhofer *et al.*, 1996; Thanbichler *et al.*, 2001).

Selen ist bereits lange als essentielles Spurenelement für Bakterien (Pinsent, 1954) und Organismen anderer Gruppen (Schwarz *et al.*, 1957; Terry *et al.*, 2000) bekannt.

Es ist in seinen chemischen Eigenschaften dem Schwefel ähnlich und kommt in der Natur in Schwefelverbindungen als Verunreinigung mit einem Anteil von 0,1-1,0 Promille vor (Forchhammer *et al.*, 1991).

Der Einbau von Selen in Proteine über die cotranslationale Insertion von Selenocystein resultiert in der Bildung von Selenoproteinen, die meist essentielle Redoxreaktionen katalysieren (Stadtman, 1996); sie sind deutlich reaktiver, weil die Selenol-Gruppe stärker nucleophil ist als die Thiol-Gruppe, speziell bei physiologischem pH (Heider *et al.*, 1993). Auch in *Bradyrhizobium japonicum* wurde eine Hydrogenase identifiziert, die die Aufnahme von H₂ unter autotrophen Wachstumsbedingungen katalysiert und deren Dereprimierung durch die Zugabe von Selenit um bis zu 200% erhöht wird (Boursier *et al.*, 1988). In vorläufigen Untersuchungen konnten Boursier und Kollegen (1988) auch eine signifikant erhöhte H₂-Aufnahme durch Bakterioide in den Knöllchen von *Vicia faba* messen, wenn Selenit zu der Nährlösung zugegeben wurde.

Selen scheint somit auch innerhalb der Symbiose Einfluß auf die Partner und auf deren Beziehung zu haben, da das H₂-Aufnahme System von *Bradyrhizobium japonicum* die Effizienz der N₂-Fixierung in den Knöllchen der Sojabohne erhöht (Evans *et al.*, 1981).

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine bislang unbekannte DNA-Region im Genom von *B. japonicum* 110*spc4* zu analysieren und die Relevanz der identifizierten Gene in der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow aufzuklären.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Branson Sonifier Cell Disruptor B15

(Ultraschallfinger)

Brutschrank, BED 400

Drucktopf Typ 8.520054c

Elektronenmikroskop Typ PW 6002/00

Elektrophoresekammern für SDS-PAGE

Feinwaage Modell 2474

Fluoreszenzmikroskop, Laborlux S

Gaschromatograph, GC 3380

Gefriertrocknungsanlage, Gamma 1A

Geldokumentationsanlage, Digit-Store-Duo

Gene Amp PCR System 2400

Gene Pulser™

Gene Quant II RNA/DNA Calculator

Integrator C-RGA Chromatopac

Kompressor, PM 8670-740.3

Kühlfalle KF

Kühlzentrifuge Modell 5402

Kühlzentrifuge Modell J2-HS

Lichtmikroskop Orthoplan

LI-COR DNA Sequencer Modell 4000

Gerhard Heinemann Labor-Ausrüstungen,
Schwäbisch Gemünd

WTB Binder Labortechnik GmbH,
Tuttlingen

Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen

Koninklijke Philips Electronics N.V.,
Eindhoven (NL)

Biometra GmbH, Göttingen

Sartorius, Göttingen

Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar

Varian GmbH, Darmstadt

Martin Christ GmbH & Co. KG,
Osterode

Intas GmbH, Göttingen

Perkin Elmer Applied Biosystems
GmbH, Weiterstadt

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Pharmacia LKB Biotechnology, Inc.,
Freiburg

Shimadzu Corporation, Kyoto (J)

KNF Neuberger GmbH, Freiburg

Bachofer GmbH, Reutlingen

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH,
Hamburg

Beckmann Instruments, San Ramen
(USA)

Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar

MWG-Biotech, Gesellschaft für angewandte
Biotechnologie mbH, München

Mikrotom, Ultracut E Reichert-Jung	C. Reichert AG, Wien (A)
Mini Hybridisation Oven	Appligene Oncor, Illkirch (F)
Model 585 Gel Dryer (Gel Trocknungsanlage)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mupid 21 (Mini Gel Migration Trough)	COSMA BIO Company, Tokyo (J)
Olympus Digital Camera C-2500 L	Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo (J)
Pulse Controller	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Schüttelwasserbad Modell 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwald
Spannungsgeber, Power Supply 250/2.5	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spektralphotometer, Uvikon 860	Kontron Instruments, Eching
Storage Phosphor Screen (Phosphoimager)	Molecular Dynamics, Sunnyvale (USA)
T Gradient Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
Thermoblock, Techne dri-Block® DB-3	thermo-Dux, Gesellschaft für Laborgerä- te, Wertheim/Main
Thermoprinter, UP-890CE	Intas GmbH, Göttingen
Tischzentrifuge, Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Tischzentrifuge, Mikro 24-48	Andreas Hettich GmbH u. Co KG, Tuttlingen
UV-Transilluminator TM2, $\lambda = 254 \text{ nm}$	UVP, Inc., San Gabriel (USA)
VacuGene Pump	Pharmacia LKB Biotechnology, Inc., Freiburg
VacuGene XL	Pharmacia LKB Biotechnology, Inc., Freiburg
Vakuum Apparatur für Plasmid Isolation	Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Vertikalsterilisator, FVS-3	Integra Biosciences (Technomara), Fernwald

2.2. Chemikalien und Materialien

2.2.1. Feinchemikalien und Verbrauchsmaterial

Agarose (DNA-)	Biozym, Hess. Oldendorf
Ap (Natriumsalz)	Boehringer, Mannheim
APS	Serva, Heidelberg
D-(+)-Biotin	Merck, Darmstadt
Blocking Reagenz	Boehringer, Mannheim
Borsäure	Mallinckrodt Baker Inc., Griesheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chlorophorm	Serva, Heidelberg
Cm (kristallin)	Sigma, Deisenhofen
DMF	Serva, Heidelberg
DMSO	Roth, Karlsruhe
DTT	Merck, Darmstadt
Essigsäure (99.8 %)	Riedel-de Haen AG, Seelze
Einmal-Filterhalter (steril - pyrogen-frei)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Eisensulfat	Sigma, Deisenhofen
EtBr	Roth, Karlsruhe
EtOH	Merck, Darmstadt
EDTA	Roth, Karlsruhe
Formamid	Serva, Heidelberg
Glycerin	Merck, Darmstadt
Gm (-Sulfat)	Serva, Heidelberg
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Km (-Sulfat)	Serva, Heidelberg
λ -DNA	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Magnesiumsulfat	Aldrich, Steinheim
Minisart NML Filter	Sartorius, Göttingen
Na-[⁷⁵ Se]-Selenit (product code: 4750)	Risø National Laboratory, Roskilde (Dk)
N-Laurylsarcosin Natrium Salz	Serva, Heidelberg
Nikotinsäure	Sigma, Deisenhofen

Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Roth, Karlsruhe
ONPG	Biomol, Hamburg
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Pyridoxin-HCl	Serva, Heidelberg
roti Phenol	Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
Sequagel™ complete	Biozym, Hess. Oldendorf
Sequagel™ XR	Biozym, Hess. Oldendorf
smart ladder (DNA-Längenmarker)	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Spc (-Dihydrochlorid)	Sigma, Deisenhofen
Spektra/Por® CE Dialyseschlauch	Serva, Heidelberg
Tc (-HCl)	Sigma, Deisenhofen
Transfermembran BiodyneA	Pall Europe Ltd., Portsmouth (UK)
Tris	Merck, Darmstadt
X-Gal	Biomol, Hamburg
X-P (Toluidin Salz)	Biomol, Hamburg

Die genauen Firmenbezeichnungen lauten (wenn nicht bereits erwähnt):

BIOMOL Feinchemikalien GmbH, Hamburg

BIOzym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Merck KGaA, Darmstadt

SERVA FEINBIOCHEMICA GmbH & Co. KG A., Boehringer Ingelheim Bioproducts
Partnership, Heidelberg

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Deisenhofen

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH Geschäftsbereich Aldrich, Steinheim

Alle weiteren benötigten Feinchemikalien wurden von der Merck KGaA in Darmstadt und die verwendeten Gase von der Messer Griesheim GmbH in Krefeld bezogen.

Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, über die MAGV GmbH in Rabenau-Londorf erworben.

2.2.2. Enzyme

Restriktionsnukleasen	Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig
RNase A	Serva, Heidelberg
T4 DNA-Ligase	USB Corporation, Cleveland (USA)
Taq Polymerase	USB Corporation, Cleveland (USA)

2.2.3. Nährmedien

Agar Agar, reinst	Roth, Karlsruhe
Antibiotic Medium No.3 (= PA-Medium)	Oxoid Limited, Basingstoke (UK)
Circle Grow® Medium	BIO 101, Inc., Vista (USA)
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Pepton	Merck, Darmstadt

2.2.4. Kits

Concert™ Rapid Gel Extraction System	GIBCO BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
DIG DNA Labelling and Detection Kit	Boehringer, Mannheim
Invisorb Spin Cell-RNA Mini Kit	Invitek Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign mbH, Berlin
Nucleospin® Multi-8 Plasmid Kit	Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Boehringer, Mannheim
QIAexpress Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway (USA)
TOPO TA Cloning®	Invitrogen Life Science, Groningen (NL)

Lagerung bei RT

Probenpuffer (SDS-PAGE), 2x:

Tris-HCl pH 6,8	160 mM
SDS	4 %
DTT	200 mM
Glycerin	20 %
Bromphenolblau	0,01 %

Lagerung bei – 20 °C

Sörensen Puffer:

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,2 M Stammlsg.
KH ₂ PO ₄	0,2 M Stammlsg.

pH 7,0
pH Einstellen durch Mischen der Stammlösungen
1:1 mischen mit A. bidest. auf 0,1 M

Tris-Acetat-EDTA- (TA-) Puffer (Maniatis *et al.*, 1982):

Tris-Acetat	40 mM
EDTA	2 mM

pH 8,0
pH einstellen mit
Essigsäure
Lagerung bei RT

Tris-Borat-EDTA- (TBE-) Puffer (Maniatis *et al.*, 1982):

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

Lagerung bei RT

Tris-EDTA- (TE-) Puffer (Maniatis *et al.*, 1982):

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

pH 8,0
Lagerung bei RT

Biotin Stammlsg., 1000x:

D(+)-Biotin	10,0 mg
A. bidest.	ad 100 ml

Sterilfiltrieren
Lagerung bei 0-4 °C

Leguminosen Nährlösung:	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	493,00 mg
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	371,00 mg
	K ₂ SO ₄	279,00 mg
	KH ₂ PO ₄	23,00 mg
	K ₂ HPO ₄	23,00 mg
	EDTA-Fe Natrium Salz x 2 H ₂ O	16,7 mg
	H ₃ BO ₃	1,43 mg
	MnSO ₄ x 4 H ₂ O	1,02 mg
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,22 mg
	CoCl ₂ x 4 H ₂ O	0,10 mg
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,08 mg
	Na ₂ MoO ₄ x 4 H ₂ O	0,05 mg
	A. bidest.	ad 1000 ml
	pH 7,0	

Lagerung bei RT (möglichst direkt verwenden)

Richardsen Lsg.:	Methylenblau	0,5 %ig
	Azurblau	0,5 %ig

1 %ige Stammlösungen der Chemikalien 1:1 mischen

RNase A Stammlsg.:	RNase A 10 mg·ml ⁻¹ in A. bidest.
---------------------------	--

Zerstören der DNase durch Aufkochen

Lagerung bei 0-4 °C

Spurenelement Stammlsg. (Tully, 1985), 1000x:	MnSO ₄	1999,0 mg
	H ₃ BO ₃	1014,0 mg
	ZnSO ₄	200,0 mg
	KI	200,0 mg
	CuSO ₄	40,0 mg
	CoSO ₄	22,48 mg
	Na ₂ MoO ₄	19,36 mg
	A. bidest	ad 200 ml

1 g Citrat zufügen, Sterilfiltrieren

Lagerung bei 0-4 °C

Spurenelement Stammlsg. für 20H und 20N(Papen *et al.*, 1980), 1000x:

H ₃ BO ₃	610 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	287 mg
MnSO ₄ x H ₂ O	169 mg
KI	66 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	25 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg
A. bidest.	ad 1000 ml

*Sterilfiltrieren**Lagerung bei 0-4 °C***Vitamin Stammlsg.**(Papen *et al.*, 1980), 1000x:

Thiamin-di-HCl	674 mg
meso-Inosit	180 mg
Nikotinsäure	123 mg
Riboflavin	113 mg
Pyridoxin-HCl	103 mg
Calcium-D-Panthotenat	95 mg
D(+)-Biotin	73 mg
p-4-Aminobenzoessäure	27,4 mg
A. bidest.	ad 100 ml

*Sterilfiltrieren**Lagerung bei 0-4 °C*

Die Zusammensetzungen der darüberhinaus verwendeten Puffer und Lösungen werden am Anfang des jeweiligen Abschnitts beschrieben.

2.3. Bakterienstämme

B. japonicum 110*spc*4 (Regensburger *et al.*, 1983): WT; Spc^r; symbiotischer Partner der Sojabohne (*Glycine max*); es handelt sich um ein Spectinomycin resistentes Derivat des Stammes 3I1b110; vom US Department of Agriculture (USDA), Beltsville, MD (USA)

<i>B. species</i> SEMIA 6144: WT; symbiotischer Partner der Erdnuß (<i>Arachis hypogaea</i>); von der Colecao de Culturas de Rhizobium de Fepagro, Fundacao Estadual de Pesquisa Agropecuaria (FEPAGRO) (Seção de Microbiologia Agricola [SEMIA]), Porto Alegre (Brasilien)
<i>R. tropici</i> CIAT 899 (Martinez <i>et al.</i> , 1985): WT; Rif ^r ; Cm ^r ; Ap ^r ; symbiotischer Partner der Garten-Bohne (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
<i>E. coli</i> DH5α (Hanahan, 1983): <i>recA1</i> , Δ <i>lacU169</i> , Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15
<i>E. coli</i> S17-1 (Simon <i>et al.</i> , 1983): <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> ⁻ , <i>hsdM</i> ⁺ , <i>recA</i> , <i>tra</i> ⁺ von RP4 ins Genom integriert
<i>E. coli</i> CB977 (Schneider <i>et al.</i> , 1987): Δ <i>lacZ</i> , <i>lacY</i> ⁺ , <i>thi</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>phoA8</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> ⁺ , <i>ilv</i> , <i>recA56</i>
<i>E. coli</i> FM433 (Zinoni <i>et al.</i> , 1990): F ⁻ <i>araD139</i> ϕ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>ptsF25 deoC1 relA1 flbB5301 rpsE13</i> ϕ (<i>srl-recA</i>) 306::Tn10, Tc ^r
<i>E. coli</i> WL 81300 (Tormay <i>et al.</i> , 1996): FM433, Δ <i>selB300</i> :: <i>kan</i> , Tc ^r , Km ^r
<i>E. coli</i> WL 81460 (Zinoni <i>et al.</i> , 1990): FM433, Δ <i>selC400</i> :: <i>kan</i> , Tc ^r , Km ^r
<i>E. coli</i> PT91422 (Tormay <i>et al.</i> , 1996): FM433, <i>rpsE</i> ⁺ <i>strA1</i> , Tc ^r
<i>E. coli</i> PT 91300 (Tormay <i>et al.</i> , 1996): PT91422, Δ <i>selB300</i> :: <i>kan</i> , Tc ^r , Km ^r
<i>E. coli</i> PT91460 (Tormay <i>et al.</i> , 1996): PT91422, Δ <i>selC400</i> :: <i>kan</i> , Tc ^r , Km ^r

2.4. Vektoren

2.4.1. Verwendete Vektoren

Vektor	Größe	Charakteristika	Referenz
pACYC184	4,24 kb	Cm ^R , Tc ^R	Rose, 1988
pBluescript® II KS+	2,96 kb	Ap ^r , <i>lacZ</i> α	Short <i>et al.</i> , 1988
pCB303	25,5 kb	Tc ^r , <i>lacZ</i> , <i>phoA</i> , <i>oriT</i>	Schneider und Beck, 1987
pJQ200SK	5,4 kb	suicide Vektor, Gm ^r	Quandt und Hynes, 1993
pK18mob (19)	3,79 kb	Km ^r , <i>lacZ</i> α , <i>mob</i> site	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pNVmob	3,81 kb	Km ^r , <i>lacZ</i> α , <i>mob</i> site	diese Arbeit (2.4.2.)
pNVDEmob	3,75 kb	Km ^r , <i>lacZ</i> α , <i>mob</i> site	diese Arbeit (2.4.2.)
pPHOK1 (2,3)	5,8 kb	Ap ^r , Km ^r , <i>phoA</i>	Rodriguez-Quinones <i>et al.</i> , 1994
pUC18 (19)	2,86 kb	Ap ^r , <i>lac</i> <i>IOPZ</i> α	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985

Darüberhinaus kamen bei der Verwendung des TOPO TA Cloning® Kit bzw. des QIAexpress Kit die kommerziellen Vektoren pCR®2.1-TOPO® bzw. pQE-60 zum Einsatz.

2.4.2. Konstruktion der Vektoren pNVmob und pNVDEmob

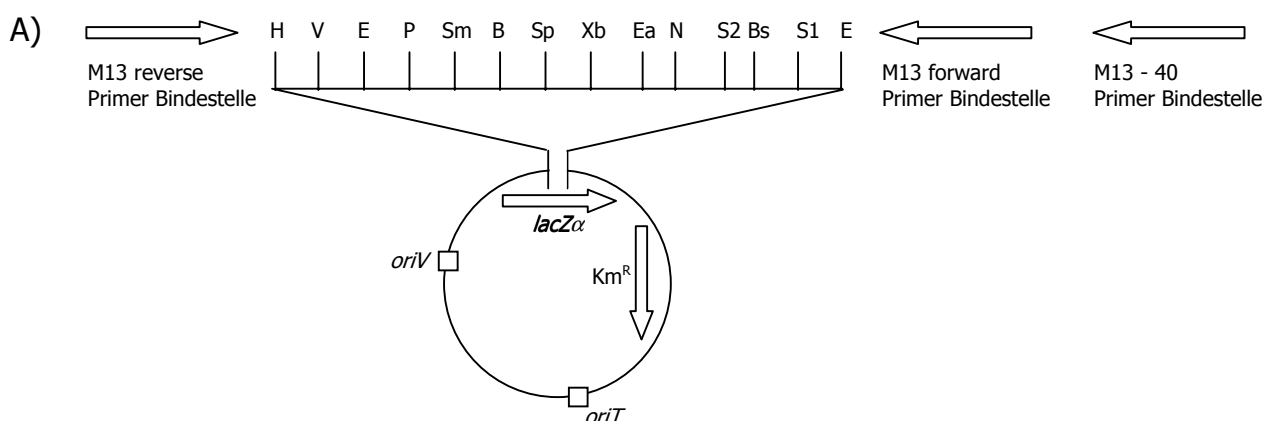
Für die Subklonierung und speziell für die Vektorintegrationsmutagenese wurde ein neues Vektoren-Paar konstruiert, um mobilisierbare Vektoren mit zusätzlichen Klonierungsmöglichkeiten zur Verfügung zu haben.

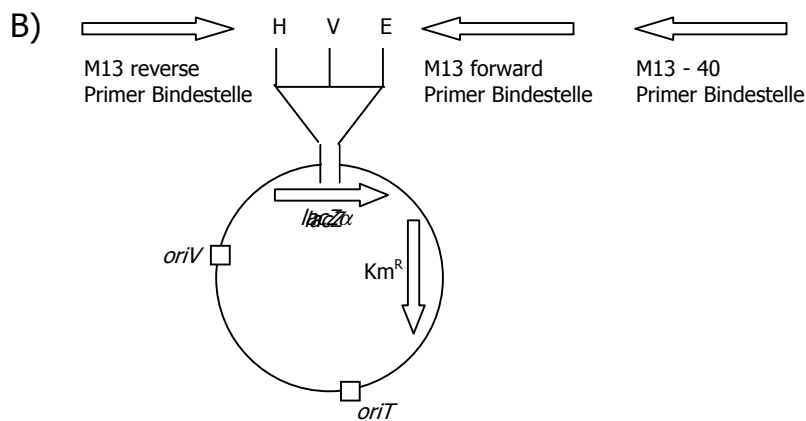
Diese neuen Vektoren sollten bei der Einklonierung von DNA-Fragmenten in *E. coli* DH5 α (und anderen alpha-komplementierenden Bakterienstämmen) die Möglichkeit der blau-weiß Selektion auf X-Gal haltigen Agarplatten bieten. Darüberhinaus sollten die klonierten Fragmente direkt mittels M13 Primern einer Sequenzkontrolle unterzogen werden können.

Zu diesem Zweck wurde ein 72 bp großes DNA-Fragment aus der multiple cloning site (mcs) von pBluescript® II KS+ (Basen 653 bis 725) mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *SacI* ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen (Basen 3578 bis 3628) in pK19mob ligiert, wobei das 51 bp große DNA-Fragment von pK19mob dadurch ersetzt wurde. Daraus resultierte der Vektor pNVmob (Abb.03A).

Das interne *EcoRI* Fragment (66 bp) innerhalb der mcs wurde deletiert, resultierend in dem Vektor pNVDEmob (Abb.03B).

Die auf diesem Weg generierten Vektoren pNVmob und pNVDEmob sind ca. 3,8 kb groß und tragen das Kanamycin Resistenzgen, für die Selektionierung in Antibiotika haltigen Medien. Für die blau-weiß Selektionierung in alpha komplementierenden *E. coli* Stämmen (wie z.B. *E. coli* DH5 α) diente das *lacZ* α Fragment in beiden Vektoren.



**Abb.03:**

- A) Der Vektor pNVmob ist 3,81 kb groß. Innerhalb der mcs befinden sich folgende Schnittstellen: *Bam*HI (B), *Bst*XI (Bs), *Eag*I (Ea), *Eco*RI (E), *Eco*RV (V), *Hind*III (H), *Not*I (N), *Pst*I (P), *Sac*I (S1), *Sac*II (S2), *Sma*I (Sm), *Spa*I (Sp), *Xba*I (Xb). Die Schnittstellen im Vektor-Bereich entsprechen denen in pK19mob.
- B) Der Vektor pNVDEmob ist ein Derivat von pNVmob, er ist 3,75 kb groß, wobei nur in der mcs Veränderungen durchgeführt wurden. Innerhalb der mcs befinden sich nach der Deletion noch folgende Schnittstellen: *Eco*RI (E), *Eco*RV (V), *Hind*III (H).

2.5. Primer

Die bei der PCR eingesetzten Primer wurden von MWG-Biotech, Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH, in München bezogen.

Es wurden folgende mit dem Infrarot-Farbstoff IRD800 am 5'-Ende markierte 5'→3' Primer bei der Sequenzierung von den Standard Primer Bindestellen in den Klonierungsvektoren aus eingesetzt:

Forward-Primer (-40), 21-mer: 5'-AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG-3'

Reverse-Primer (-49), 24-mer: 5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3'

Darüber hinaus wurden Primer für die Amplifizierung verschiedener DNA-Fragmente sowie für die direkte Sequenzierung (in diesem Falle sind die verwendeten Primer mit dem Infrarot-Farbstoff IRD800 am 5'-Ende markiert) mittels PCR verwendet.

Die DNA-Konzentration der jeweiligen Primerlösung wurde durch Verdünnen mit A. bidest. auf die benötigte Molarität eingestellt. Für Sequenzierungen betrug die Konzentration der Primer 2 pmol·μl⁻¹, für PCR Amplifizierungen 10 pmol·μl⁻¹.

Die Sequenz ist jeweils in 5'-3' Richtung angegeben.

IUB Code:	B	C / G / T
	N	A / C / G / T
	K	T / G
	R	A / G
	S	C / G
	Y	C / T

IRD800 markierte Primer für die Sequenzierung der DNA-Region der *TnphoA*-Insertion:

210BUB5	CGA AAA TTC CAG CGG GCC GC
210BUB6	CGA TCT CCA GGG CCA TCC CG
BUB7	CGA TTG ACG CCA CCA TGC CG

Komplementation:

210-EcoRV	CGA TCA CGA TGG ATA TCT ACA GTC
210-BglII	GAA GGA AAG ATC TTC GGT CAT GGC
BUB9	GAC CGG CTA CAG GAA AGC G
BUB10	CAT CGT CTC GGC GCT AGG C
Bub11	GGG CCA TTC CTC AAT CGC G

VIM:

ORF4:

VIM4fw	GGC CAT GCG CGA CCA CGA GG
VIM4rev	CGC CCT CTC CAC CAT GGA CC

ORF5:

VIM5fw	GTT CGA CAA GCG CGA GCA GGG
VIM5rev	GCG CGG CGC TCA CTC TTT GGC

SebP:

sebPfw	GAT GGA AGC ACC TGC GGA GAA CTT TG
sebPrev	CGG TCG ATY TCC CAT CGT CCA AGG

Selenocystein-Apparat:

selAfw2	CAY ACC AAC CTK GGS CG
selAfwY	CGG GNA CGG TGC TTC ATA CC
selArevY	CCA NCA NCT TGT CGC CGG
selBfwX	GTC GGC ACG GCN GGG CAT AT
selBEcrev	GCG ATC GCG GAA ATC CGC CG
selDEcfw	CAG CCA CGG AGC TGG TTG
selDrev	GCC NGA GGT iTG CGG ATC

Überexprimierung:

NcoIORF210N	GCC CAT GGC TGC ACC GAG GAA GAG G
BglIIORF210C	CGA GAT CTT AAC GCC GAC GAG CGG G

RGF für TGA Translations Studien:

SCKon-fw	TTC CCG GGT CTG GCG CGA GAA G
SCKon-rev2	ACC TGC AGC CCG CGA CCG GTG C
2U2ATGfw	CAG TGG CCA GAT GCC GC
2U2ATGrev	CCT CCT TCG CGC TCG G
2U2TGAfw	CAA TTC CGC CAG ATA ATG C
2U2TGArev	CTC GAC GGC GCC GTG C
RGF Δ fw	TCG CTT CAA GAC CTC GGT CGA C
RGF Δ rev	CCA AGC TTG GCG CGC ACG GC

2.6. Sterilisation von Verbrauchsmaterial und Nährmedien

Die verwendeten Kunststoffartikel (z.B. Pipettenspitzen, Eppendorf Reaktionsgefäße, etc.) sowie die hitzestabilen Nährmedien und Lösungen wurden im Vertikalsterilisator bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min autoklaviert.

Lösungen mit hitzelabilen Bestandteilen wurden mittels Einmal-Filterhaltern (Rotrand - 0,2 µm - steril - pyrogen-frei) sterilfiltriert.

Die Sterilisation von Glasgeräten erfolgte bei 180 °C für mindestens 2,5 h.

2.7. Anzucht und Stammhaltung von Bakterien

2.7.1. Nährmedien zur Anzucht von *B. japonicum* Stämmen

20E-Medium (Werner <i>et al.</i> , 1975):		
	Glycerin	4,60 g
	Hefeextrakt	2,00 g
	Mannit	1,82 g
	KNO ₃	506 mg
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370 mg
	K ₂ HPO ₄	87 mg
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	73,5 mg
	KH ₂ PO ₄	68 mg
	EDTA-Na ₂	9,30 mg
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	6,95 mg
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	4,84 mg
	A. bidest.	ad 1000 ml
	pH 6,8	

20H:	Glycerin	4,60 g
	Saccharose	3,42 g
	Mannit	1,82 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370 mg
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	138 mg
	KNO ₃	101 mg
	KCl	74,5 mg
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	73,5 mg
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	17,8 mg
	EDTA-Na ₂	9,30 mg
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	6,95 mg
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	4,84 mg
	A. bidest.	ad 998 ml
	pH 6,8	
	Spurenelement Stammlsg.	1 ml
	Vitamin Stammlsg.	1 ml

20H-Se1:

Dieses Medium basiert auf dem Medium 20H, MgSO_4 ist allerdings in gleicher Molarität durch MgCl_2 ersetzt. Darüberhinaus wurden auch bei den Spurenelementen die Sulfate durch Chloride in gleicher Molarität ersetzt.

20N (Papen <i>et al.</i> , 1980):	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	6,82 g
	Glycerin	4,60 g
	Na-Succinat	2,70 g
	Mannit	1,82 g
	L-Leucin	1,31 g
	K_2HPO_4	783 mg
	D-Arabinose	375 mg
	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	370 mg
	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	73,5 mg
	EDTA- Na_2	9,30 mg
	$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	6,95 mg
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	4,84 mg
	A. bidest.	ad 998 ml
	pH 6,8	
	Spurenelement Stammlsg.	1 ml
	Vitamin Stammlsg.	1 ml

*Einstellen des pH-Wertes durch Einstellen der
Phosphat Gemisch Lsg. auf pH 5,8*

20N-Se2:

Dieses Medium basiert auf dem Medium 20N, MgSO_4 ist allerdings in gleicher Molarität durch MgCl_2 ersetzt. Darüberhinaus wurden auch bei den Spurenelementen die Sulfate durch Chloride in gleicher Molarität ersetzt.

High K+ Medium (Gober <i>et al.</i> , 1985):	1. KH_2PO_4	1,02 g
	$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg
	2. $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	197 mg
	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	7 mg
	3. Na-Succinat	3,32 g
	D-Arabinose	1,00 g
	Glutamat	147 mg
	pH 6,3	
	A. bidest.	ad 1000 ml

*1., 2. und 3. in entsprechenden Volumina A. bidest. lösen
1. und 2. getrennt autoklavieren, 3. steril filtrieren*

PSY-Medium:	Pepton	3,00 g
	D-(-)-Mannit	1,00 g
	Hefeextrakt	1,00 g
	KH_2PO_4	0,03 g
	Na_2HPO_4	0,03 g
	CaCl_2	0,05 g
	A. bidest.	ad 997 ml
	pH 6,8	
	Biotin Stammlsg.	2 ml
	Spurenelementstammlsg., Tully	1 ml

2.7.2. Nährmedien zur Anzucht von *E. coli* Stämmen

Circle Grow® Medium (BIO 101, USA):

Das Fertigmedium wurde nach Angaben des Herstellers in Wasser gelöst und vor Gebrauch autoklaviert.

Das Circle Grow® Medium hat den Vorteil, daß *E. coli* darin sehr schnell wächst, so daß eine Flüssigkultur bereits 8 h nach dem Animpfen für die Plasmidisolierung geerntet werden kann.

Allerdings sterben die Bakterienzellen bei Anzucht in Circle Grow® Medium auch relativ schnell ab. Das Medium eignet sich daher weder für die Stammhaltung noch für Agarplatten.

LB-Medium (Maniatis <i>et al.</i> , 1982):	Pepton	10,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	NaCl	50,0 g
	A. bidest.	ad 1000 ml
	pH 7,5	

LBG-Medium (Maniatis *et al.*, 1982):

Dieses Medium entspricht dem LB-Medium, unter Zusatz von 1 g Glucose pro Liter Medium.

PA-Medium (Oxoid, UK):

Dieses Fertigmedium, mit der exakten Bezeichnung Antibiotic Medium No.3, wurde nach Angaben des Herstellers in A. bidest. gelöst und vor Gebrauch autoklaviert.

2.7.3. Konzentrationen von Antibiotika und anderen Zusätzen

Zusatz	Lösungsmittel	Konzentration im Medium (w/v)	
		für <i>E. coli</i> Stämme	für <i>B. japonicum</i> Stämme
Ap	A. bidest.	50 mg·l ⁻¹	200 mg·l ⁻¹
Cm	EtOH 96% (v/v)	30 mg·l ⁻¹	/
Gm	A. bidest.	10 mg·l ⁻¹	100 mg·l ⁻¹
IPTG	A. bidest.	30 – 100 mg·l ⁻¹	/
Km	A. bidest.	50 mg·l ⁻¹	150 mg·l ⁻¹
Kongorot	A. bidest.	/	25 mg·l ⁻¹
Spc	A. bidest.	/	200 mg·l ⁻¹
Tc	EtOH 50% (v/v)	10 mg·l ⁻¹	/
X-Gal	DMF	40 mg·l ⁻¹	40 mg·l ⁻¹
X-P	DMF	40 mg·l ⁻¹	40 mg·l ⁻¹

Zur Herstellung von Agarnährmedien wurde dem entsprechenden Medium vor dem Autoklavieren Agar Agar in einer Konzentration von 15 g·l⁻¹ zugesetzt.

2.7.4. Anzuchtbedingungen von Bakterienkulturen

Die Anzucht der Bakterien erfolgte unter konstanten Temperaturbedingungen.

E. coli Kulturen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C angezogen, Kulturen der Rhizobien Stämme bei 28 °C in einem Brutraum.

Die Inkubation unter aeroben Bedingungen erfolgte bei Flüssigkulturen bis zu einem Volumen von 10 ml in Reagenzgläsern auf einem Roller, größere Kulturvolumina wurden in Erlenmeyerkolben auf einem Kreisschüttler inkubiert.

Die mikroaerobe Anzucht von Flüssigkulturen mit einem Volumen von 10 ml erfolgte in 50 ml Erlenmeyerkolben, die in einem gasdicht geschlossenen 1,25 l Drucktopf inkubiert wurden. Der Drucktopf wurde, nach dem Beschicken mit den Kulturen, für 15 min mit N₂ gespült. Anschließend wurden 5 % des Volumens durch Luft ersetzt, dies resultierte in einer O₂ Konzentration von ca. 1 % in der Gasphase. Die Inkubation erfolgte auf einem Kreisschüttler bei 110 rpm.

Selektive Anzucht wurde durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika zum Nährmedium erreicht.

2.7.5. Stammhaltung von Bakterienkulturen

Die Stammhaltung erfolgte auf möglichst selektiven Agarplatten aus PSY-Medium (Rhizobien) bzw. PA-Medium (*E. coli*), die nach der Anzucht bei 4 °C aufbewahrt wurden. Desweiteren wurden Kulturen in Form von Glycerinkulturen bei -75 °C gelagert. Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurden 0,5 ml Glycerin zu 0,5 ml einer spätlogarithmischen Flüssigkultur in 20E-Medium (Rhizobien) bzw. LB-Medium (*E. coli*) gegeben.

Für eine längerfristige Stammhaltung wurden Flüssigkulturen von Bakterienstämmen (in der logarithmischen Phase) gefriergetrocknet und unter Vakuum in Glas-Ampullen eingeschweißt.

2.8. Anzucht und Wachstumsbedingungen der Pflanzen

2.8.1. Keimung und Anzucht von *Glycine max*

Die Samen der Sojabohne *Glycine max* bv. Maple Arrow wurden durch 11minütiges Waschen in 30 %igem H₂O₂ oberflächensterilisiert.

Anschließend wurden die Samen zehnmal mit sterilem Leitungswasser gespült und daraufhin für sechs bis sechzehn Stunden in sterilem Leitungswasser bei 28°C unter leichtem Schütteln inkubiert (Quellung). Nach Ablauf von etwa der halben Zeit wurde das Wasser unter mehrmaligem Waschen der Samen gewechselt. Nach der Quellung wurden die Samen nochmals zehnmal mit sterilem Leitungswasser gewaschen und dann auf Leitungswasseragarplatten (1 l Leitungswasser, 15 g Agar Agar) ausgelegt.

Die darauffolgende Inkubation erfolgte bei 28°C im Dunkeln für drei Tage (Keimung).

2.8.2. Inokulation der Pflanzen

Die Keimlinge von *Glycine max* wurden für ca. 30 min in einer Petrischale mit einer Suspension des jeweiligen Bakterienstammes inokuliert. Die Bakteriensuspension enthielt ca. 10⁶ – 10⁸ cfu pro ml.

Anschließend wurden die Keimlinge in Leonard Jars gepflanzt (Pflanzgranulat aus einem Vermiculit/Perlit Gemisch mit Legunimosen Nährlsg.) und jeweils 1 ml der entsprechenden Bakteriensuspension an die Keimwurzel pipettiert.

2.8.3 Wachstumsbedingungen im Pflanzentest

Das Wachstum der Pflanzen erfolgte unter definierten Bedingungen in einer Klimakammer.

Eine 14stündige Lichtphase, mit einer Temperatur von 25 °C und einer Belichtung durch 15.000 Lux, wurde gefolgt von einer zehnstündigen Dunkelphase, mit 20 °C und 0 Lux. Die relative Luftfeuchte betrug ständig 75 %.

Die Pflanzen wurden nach der Inokulation mit den Bakterien für mindestens 21 Tage unter diesen Bedingungen angezogen.

2.9. *In vivo* Tests zur Aktivitäts Bestimmung bakterieller Enzyme

2.9.1. Acetylenreduktionstest

Beim Acetylenreduktionstest nach Koch und Evans (Koch *et al.*, 1966) wurde die Nitrogenaseaktivität der Wurzelballen der geernteten Glycine max Pflanzen gemessen. Die Wurzeln wurden ohne den Sproß in 60 ml Reagenzgläser verbracht und diese mit einem gasdichten Stopfen verschlossen.

Mit Hilfe von gasdichten Spritzen wurden 5 ml der Atmosphäre im Rg durch Ethin (Acetylen) ersetzt (das entspricht etwa 10 % der Gasphase, ist aber in jedem Fall ein Überschuß an Ethin und damit ausreichend für diesen Ansatz). Diese Reaktionsansätze wurden für eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert.

Die Ermittlung der in Ethen (Ethylen) umgesetzten Ethin-Menge erfolgte durch gaschromatographische Analyse von jeweils zwei 0,5 ml Proben. Die Ethenkonzentration in der Probe wurde mittels der Peakhöhe des Integrators berechnet.

Als Standard diene ein definiertes Gasgemisch aus Ethen und Stickstoff mit einer Ethenkonzentration von $2 \text{ nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$. Es wurde pro Messung des Eichgemisches (0,5 ml eingespritztes Volumen) 1 nmol Ethen analysiert, mit einer Retentionszeit von 0,45 min.

Injektor T: 200 °C

Säulen T: 70 °C

Detektor T: 200 °C

Säule: Chromopak 10 m x 0,32 mm Coated with Poraplot V DF 10 µm

Detektor: Flammen Ionisations Detektor (FID)

Trärgas: Stickstoff (N₂)

Brenngase: synthetische Luft
Wasserstoff (H₂)

Die Aktivität wurde berechnet in $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg KFG}^{-1}$

$$= \frac{\text{Ethengehalt des Eichgemisches} \cdot \text{Fläche des Meßpeak} \cdot \text{Volumen des Inkubationsgefäßes}}{\text{Fläche des Eichpeak} \cdot \text{Inkubationszeit} \cdot \text{KFG}}$$

Die verwendeten Werte wurden in folgenden Einheiten eingesetzt:

Ethengehalt des Eichgemisches: $\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$

Volumen des Inkubationsgefäßes: ml

Inkubationszeit: h

KFG: mg

2.9.2. Weichagartest

Der Weichagartest diente zum Nachweis der Nitrogenaseaktivität bei freilebenden Bakterien, da *Bradyrhizobium japonicum* auch außerhalb des pflanzlichen Symbiosepartners in der Lage ist, molekularen Stickstoff zu fixieren, wenn die dafür nötigen äußeren Bedingungen gegeben sind.

Das Medium High K⁺ wurde als Weichagar (0,175 % Agar) angesetzt, autoklaviert und anschließend bis auf ca. 30 °C abgekühlt. Nun wurden 50 ml Weichagarmedium mit 50 µl einer logarithmischen Bakterienkultur, angezogen in Vollmedium (20E), vermischt. Je 10 ml des Bakterien-Agar-Gemisches wurden in sterile Reagenzgläser (Gesamtvolumen ca. 20 ml) gefüllt und diese mit sterilen Gazestopfen verschlossen.

Die Inkubation der Kulturen erfolgte stehend bei 28°C für 14-21 d.

Das Wachstum der Bakterien wurde durch Photographie dokumentiert.

Anschließend wurde mit den Bakterienkulturen ein Acetylenreduktionstest durchgeführt (siehe 2.9.1.). Auch hier wurde das jeweilige Rg mit einem gasdichten Stopfen verschlossen und ca. 10 % (1 ml) des Volumens der Gasphase wurden durch Ethin ersetzt. Die Inkubationszeit wurde auf 1,5-25 h verlängert, gaschromatographische Analyse und Auswertung erfolgten wie in 2.9.1. beschrieben.

2.10. Isolierung von DNA aus Bakterien

Für die DNA-Isolierung wurde der gewünschte Klon in flüssigem Vollmedium bis zur späten logarithmischen Phase aerob angezogen (*B. japonicum* möglichst in PSY bei 28 °C; *E. coli* möglichst in Circle Grow® bei 37 °C).

2.10.1. Minipräparation von Plasmiden

Puffer 1

(Suspendierungspuffer):

Tris-HCl 50 mM

EDTA 10 mM

pH 8,0

RNase A 10 mg·l⁻¹

Puffer 2

(Lysepuffer):

NaOH 200 mM

SDS 1 % (w/v)

Lagerung bei RT

Puffer 3

(Neutralisierungspuffer):

K-Acetat 2,5 M

pH 4,5

Lagerung bei RT

Autoklavieren vor RNase-Zugabe, Lagerung bei 0-4 °C

Wenn nicht anders erwähnt, wurde die Minipräparation nach folgendem Standard-Protokoll durchgeführt:

- Anzucht von Flüssigkulturen in je 5 ml Circle Grow® Medium
- 3,0 ml Kultur bei ca. 22.000 g für 30 s zentrifugieren
(erfolgte durch Zentrifugieren von zweimal je 1,5 ml Kultur in einem Eppendorf Reaktionsgefäß und anschließendem Verwerfen des jeweiligen Überstandes)
- Überstand (mit Pipette) vollständig entfernen
- Pellet in 250 µl Puffer 1 suspendieren
- 250 µl Puffer 2 zugeben, mischen durch mehrfaches Invertieren
- Inkubation bei RT für 5 min
- 250 µl Puffer 3 zugeben, mischen durch mehrfaches Invertieren
- Zentrifugation bei ca. 22.000 g für 15 min
- Überstand in neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführen, Pellet verwerfen
- 50 µl Phenol/Chloroform (1/1 : v/v) zugeben, intensiv mischen
- Zentrifugation bei ca. 22.000 g für 15 min
- wässrige (obere) Phase in neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführen, organische Phase verwerfen
- 750 µl 2-Propanol zugeben, mischen durch vorsichtiges Invertieren
- Zentrifugation bei ca. 16.000 g für 30 min bei RT
- Überstand verwerfen
- Pellet zweimal mit je 500 µl EtOH 70 % (v/v) waschen
- Pellet unter sterilen Bedingungen an der Luft trocknen
- Pellet in adäquater Menge TE-Puffer aufnehmen
(20-100 µl TE-Puffer, abhängig von der Kopienzahl des Plasmids)
- Messung der DNA-Konzentration mit Hilfe des Gene Quant II

} optional

2.10.2. Minipräparation von Plasmiden unter Verwendung des Macherey Nagel Systems

Es wurden acht (bzw. ein Vielfaches von acht) 5 ml Flüssigkulturen angezogen in Circle Grow® Medium. Die Bakterienzellen von jeweils 3,0 ml der Flüssigkulturen wurden durch Zentrifugation bei ca. 22.000 g für 30 s pelletiert (in Eppendorf Reaktionsgefäßen

zweimal je 1,5 ml Flüssigkultur zentrifugieren und den Überstand anschließend verwerfen) und dann vollständig vom Überstand befreit.

Die darauffolgende Minipräparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers, wobei das Lysat nach dem Zellaufschluß durch 15 minütige Zentrifugation bei ca. 22.000 g von Feststoffen (hauptsächlich festes und ausgefälltes Zellmaterial) getrennt wurde.

Die Plasmid DNA wurde mit sterilem A. bidest. aus der Säulchenmatrix eluiert.

Die Ausbeute betrug pro Kultur ca. 75 µl DNA-Lsg. mit DNA-Konzentrationen, die bei high copy Plasmiden von ca. 3-9 kb (wie zum Beispiel pBs) im Bereich von 200-400 ng·µl⁻¹ lagen.

Die auf diesem Weg isolierte Plasmid DNA wurde unter anderem für die Sequenzierungen eingesetzt.

2.10.3. Isolierung von Gesamt DNA aus Bakterien

- 2 ml Bakteriensuspension zentrifugieren (Tischzentrifuge, 14000 rpm, 2 min)
- Überstand verwerfen
- Pellet zweimal mit 0,85 % NaCl waschen
- Pellet + 756 µl 1x TE Puffer
+ 40 µl 10 % SDS
+ 4 µl Proteinase K (20 mg/ml)
- Inkubation: 37 °C für 60 min
- Ansatz + 133,3 µl 5 M NaCl
+ 106,7 µl CTAB Lsg (10 % [w/v] CTAB; 4,1 % [w/v] NaCl)
- Inkubation: 65 °C für 15 min
- Ansatz + 850 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1), intensiv mischen
- Zentrifugation: Tischzentrifuge, 14000 rpm, 10 min
- Wäßrige (obere) Phase in ein neues Eppendorf Cup überführen
- Ansatz + 850 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1), intensiv mischen
- Zentrifugation: Tischzentrifuge, 14000 rpm, 10 min
- Wäßrige (obere) Phase in ein neues Eppendorf Cup überführen
- Ansatz + 470 µl 2-Propanol, vorsichtig mischen (Fällen der DNA)
- Zentrifugation: Tischzentrifuge, 14000 rpm, 2 min
- Pellet zweimal mit 70 % Ethanol waschen
- Pellet unter sterilen Bedingungen an der Luft trocknen

➤ Pellet in 50 µl TE Puffer lösen

Inkubation:	55 °C	10 min
	RT	2 h
	4 °C	ü.N.

➤ Messung der DNA-Konzentration mit Hilfe des Gene Quant II

2.11. Präzipitation von DNA

Um gelöste DNA zu reinigen und zu konzentrieren, wurde durch Zugabe von sterilem A. bidest. und einer 2,5 M NaCl Lsg. eine Salzkonzentration von 0,1 M in der DNA-Lsg. eingestellt. Anschließend wurden 2,0 Volumenanteile EtOH 96 % (v/v) zugesetzt und dieser Ansatz nach vorsichtigem Mischen bei -20 °C für ≥ 30 min inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei ca. 22.000 g für 30 min bei RT. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet daraufhin zweimal mit EtOH 70 % (v/v) gewaschen, zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe einer Pipette vollständig entfernt. Das Pellet wurde unter sterilen Bedingungen getrocknet und in einer adäquaten Menge an sterilem A. bidest. oder TE-Puffer gelöst.

Wenn nötig wurden vorhandene Proteine (beispielsweise bei Gewinnung der DNA aus einem Restriktionsansatz) vor der Fällung der DNA durch Zugabe von Phenol-Chloroform (50/50 v/v), Mischen durch Invertieren und anschließendes Zentrifugieren bei ca. 22.000 g für 15 min bei RT aus der wäßrigen Phase entfernt.

2.12. Bestimmung der DNA-Konzentration

2.12.1. Spektralphotometrie

Die Konzentration und die Reinheit von DNA-Lösungen konnten mit Hilfe des Spektralphotometers überprüft werden. Die Absorptionswerte einer verdünnten DNA-Lsg. bei 260 nm und bei 280 nm wurden ermittelt oder es wurde ein vollständiges Absorptionsspektrum zwischen 220 nm und 300 nm aufgenommen. Bei einer ds DNA-Konzentration von $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ beträgt der Absorptionswert bei 260 nm etwa 1,0. Der Anstieg des Quotienten aus Abs_{260} und DNA-Konzentration ist im Absorptionsbereich von 0-1 linear, daher konnte die Konzentration verdünnter DNA-Lösungen direkt aus der

Absorption bei 260 nm berechnet und durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die DNA-Konzentration der Ausgangslösung ermittelt werden.

Um den Reinheitsgrad einer DNA-Lsg. zu bestimmen wurde der Quotient aus Abs_{260} und Abs_{280} berechnet, er sollte für gereinigte und entsalzte DNA-Lösungen bei 1,8-1,9 liegen (Ausubel *et al.*, 1992).

2.12.2. Spektralphotometrie unter Verwendung des Gene Quant II

Eine schnelle Methode zur Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lsg. ist die Nutzung des Gene Quant II RNA/DNA Calculators.

Hierzu wurde ein Aliquot der zu messenden DNA-Lsg. mit A. bidest. auf ein Gesamtvolumen von 70 μ l verdünnt (Standardverdünnung = 1:35) und dann im Gerät gegen A. bidest. als Referenz gemessen.

Bei dem Gene Quant II handelt es sich um ein Spektralphotometer mit integriertem Rechner. Die Art der DNA (ds oder ss) und der Verdünnungsfaktor wurden eingegeben. Das Ergebnis, die DNA-Konzentration der Lsg., wurde durch den Gene Quant II berechnet und konnte direkt angezeigt und ausgedruckt werden.

2.12.3. Agarosegelelektrophorese

Eine weitere Möglichkeit zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen ist der unter UV-Licht durchgeführte Vergleich der Fluoreszenzintensität einer unbekannten Lsg. mit der von Standardlösungen bekannter DNA-Konzentration, nach Anfärben mit Ethidiumbromid.

Hierzu wurden in 10 μ l Gesamtvolumen mehrere Standardlösungen mit unterschiedlichen DNA-Mengen zwischen 5 ng und 200 ng aus λ -DNA hergestellt, sowie drei Verdünnungsstufen (1:1, 1:10, 1:100) der zu untersuchenden Lsg..

Die Proben wurden nebeneinander in die Taschen eines 0,8 %igen (w/v) Agarosegels gegeben. Das Gel wurde nach 30 min Elektrophorese bei 50 V für ca. 15 min in eine wässrige Ethidiumbromid Lsg. ($5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) gelegt und schließlich auf den UV-Transilluminator verbracht. Bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ wurde eine Aufnahme des Agarosegels gemacht, auf ihr konnten die Intensitäten der Banden verglichen und die DNA-Konzentration der untersuchten Lsg. anhand der Standards bestimmt werden.

2.13. Enzymatische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die enzymatische Spaltung von DNA erfolgte in einem Ansatz von 20 μl (wenn nötig wurden Restriktionsansätze von größerem Volumen hergestellt, die eingesetzten Volumina der verschiedenen Bestandteile wurden dann entsprechend angepaßt).

Die DNA-Lsg. wurde vorgelegt und mit A. bidest. auf 17,7 μl aufgefüllt, anschließend wurden 2,0 μl des jeweils vom Hersteller empfohlenen 10fach Puffers zugesetzt.

Als letztes wurden dem Ansatz 0,3 μl der Restriktionsendonuklease beigefügt.

Wurde die DNA gleichzeitig mit mehreren Restriktionsendonukleasen geschnitten, so wurde ein Reaktionspuffer gewählt, bei dem alle beteiligten Enzyme möglichst hohe Aktivität zeigen und das eingesetzte Volumen A. bidest. wurde entsprechend des zusätzlich verwendeten Volumens an Restriktionsendonukleasen verringert.

Der Reaktionsansatz wurde nach vorsichtigem Mischen bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur für mindestens 2 h inkubiert (die Inkubationszeit richtete sich nach der DNA-Menge, der Anzahl der erwarteten Schnittstellen und der Aktivität des verwendeten Enzyms).

Wurde DNA aus Präparationen ohne RNase-Behandlung eingesetzt, so wurden im Reaktionsansatz 2,0 μl A. bidest. durch 2 μl RNase-A-Lsg. ($10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) ersetzt.

2.14. Agarosegelelektrophorese und Dokumentation der Gele

2.14.1. Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Es wurden Agarosegele mit verschiedenen Maßen eingesetzt (Standard: 15,0 cm x 13,0 cm x 0,7 cm; für die Mupid 21 Apparatur: 11,0 cm x 10,0 cm x 0,4 cm; 10,5 cm x 6,0 cm x 0,4 cm; 5,0 cm x 6,0 cm x 0,4 cm).

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Moleküle wurden Agarosekonzentrationen von 0,5-2,0 % (w/v) verwendet (je größer die DNA-Moleküle, desto niedriger wurde die Agarosekonzentration gewählt) - Standardkonzentration war 0,8 %.

Zu diesem Zweck wurde DNA-Agarose in der entsprechenden Konzentration in TA-Puffer (1fach bei Standard Gelen, bzw. 0,5fach bei Gelen der mupid Apparatur) aufgeköcht und damit in Lsg. gebracht. Die unter Rühren leicht abgekühlte Gellösung wurde in einen Horizontal-Gelhalter gegossen und bei RT aufbewahrt, bis das Gel vollständig polymerisiert war (ca. 30 min).

Zur Aussparung der Taschen diente während der Zeit des Polymerisierens ein Kamm. Die Anzahl der Taschen und deren Fassungsvermögen konnte durch die Wahl unterschiedlicher Kämmen variiert werden.

Die aufzutrennende DNA-Lsg. wurde mit ca. 10% Beschwerungspuffer versetzt und in die Taschen des Agarose Gels eingefüllt. Als Längenmarker diente die smart ladder oder mit *EcoRI* und *HindIII* restringierte λ -DNA.

In einer Submers-Horizontal-Elektrophorese-Apparatur erfolgte dann bei RT die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente. Als Laufpuffer diente TA-Puffer der gleichen Konzentration, wie für die Herstellung des jeweiligen Agarosegels verwendet; die Spannung betrug 20-100 V und die Stromstärke lag bei 50-200 mA.

Wurde die elektrophoretische Auftrennung bei einer Spannung von mehr als 35 V durchgeführt, so erfolgte nach dem Befüllen der Taschen zuerst das Anlegen einer Spannung von 35 V für ca. 10 min. Nach dieser Einlaufphase, in der die DNA-Fragmente in das Agarosegel diffundierten, wurde die Spannung auf den gewünschten Wert erhöht. Das Agarosegel wurde nach Abschluß der Elektrophorese zur Visualisierung der DNA für ca. 15 min in eine wäßrige Ethidiumbromid Lsg. ($5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) gelegt und konnte danach auf dem UV-Transilluminator ($\lambda = 254 \text{ nm}$) ausgewertet werden.

2.14.2. Aufnahme von Agarosegelen unter Verwendung einer Geldokumentationsanlage

Mit der Geldokumentationsanlage Digit-Store-Duo konnte das auf dem UV-Transilluminator befindliche Agarosegel digitalisiert werden, wobei der Bildausschnitt durch die Verwendung eines Zoom-Objektives frei wählbar war. Auf einem Bildschirm wurde die Auswertbarkeit des Gelbildes durch Veränderung von Helligkeit und Kontrast optimiert. Das so entstandene Bild konnte mittels eines Videoprinters ausgedruckt werden. Wichtige Gelbilder wurden außerdem direkt auf Diskette gespeichert, um sie mit Hilfe eines Computers weiter bearbeiten und in Dokumente einfügen zu können.

2.15. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die DNA-Extraktion aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des Concert™ Rapid Gel Extraction System nach den Empfehlungen des Herstellers.

Die DNA wurde abschließend mit 0,2fachem TE-Puffer eluiert und bei ca. 4 °C gelagert.

2.16. Ligation

Für die Ligation wurde die T4 DNA Ligase mit dem gelieferten 10fach Puffer verwendet.

Um die Effektivität der Ligation zu optimieren, wurde zuerst die Konzentration der zu ligierenden DNA-Moleküle in den jeweiligen Lösungen ermittelt.

Für die Ligation von zwei verschiedenen DNA-Molekülen (intermolekulare Ligation) wurden pro 10 µl Ligationsansatz ca. 50 ng·kb⁻¹ der Vektor-DNA eingesetzt und von der Insert-DNA etwa die vierfache Menge (ca. 200 ng·kb⁻¹).

Für die Religation eines DNA-Moleküls (intramolekulare Ligation) wurde im Ligationsansatz eine DNA-Konzentration von ca. 5 ng·kb⁻¹ pro 10 µl Reaktionsansatz eingestellt.

Die Zugabe von Puffer und Enzym erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das Endvolumen des Ligationsansatzes wurde durch Auffüllen mit A. bidest. erreicht.

Die Einhaltung der Reaktionsbedingungen wurde durch die Verwendung eines Thermocyclers gewährleistet.

T/°C	16	19	22	55
t/min	480	90	90	5

Nachdem das Programm vollständig abgelaufen war, hielt der Thermocycler die Proben bis zur Entnahme auf konstant 4 °C.

Die weitere Verwendung von Ligationsansätzen (meist die Transformation) sollte möglichst umgehend nach Abschluß der Ligation erfolgen. Wenn eine Lagerung der Ligationsansätze unumgänglich war, erfolgte diese bei –20 °C (nicht länger als 3 d).

2.17. Nichtradioaktive Markierung von DNA mit Digoxigenin

Die Herstellung von Digoxigenin (DIG) markierten DNA-Sonden erfolgte unter Verwendung des PCR DIG Probe Synthesis Kit.

Durch die Auswahl geeigneter Primer wurde ein bestimmter Bereich der eingesetzten template DNA mit Hilfe einer PCR amplifiziert und gleichzeitig mit DIG markiert. Dazu wurde das PCR DIG Probe Synthesis Kit nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Optional wurde in einigen Fällen eine PCR Reaktion mit Taq Polymerase nach Angaben des Enzym-Herstellers durchgeführt, wobei statt unmarkierter dNTP Lsg. die DIG dNTP Lsg. des PCR DIG Probe Synthesis Kit eingesetzt wurde.

Die Bedingungen der PCR wurden wie folgt gewählt:

Beginn:	vollständige Denaturierung:	95 °C	45 s
		94 °C	105 s
Hauptprogramm:	30 Zyklen des PCR-Abschnittes:		
	Denaturierung:	94 °C	30 s
		93 °C	30 s
	Annealing:	aT °C	60 s
	Extension:	72 °C	Y min
Abschluß:	zusätzliche Extension:	72 °C	3·Y min

Die annealing Temperatur (aT) ist abhängig von dem jeweils eingesetzten Primer Paar.
Die Extensionszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes, sie betrug 1 min pro angefangener kb.

2.18. Southern Blotting

2.18.1. Übertragung der DNA auf eine Nylonmembran mittels Vakuumblootting

- Vorbereiten der Apparatur (Aufbauen und poröse Platte wässern)
- Aufbringen von Nylonmembran, Plastikfolie und Agarosegel
- Überschichten des Gels mit Denaturierungspuffer
- Unterdruck anlegen: 35 mbar für 20 min (ständig mit Puffer bedeckt halten)
- Restlichen Puffer mit Spritze abnehmen
- Überschichten des Gels mit Neutralisierungspuffer
- Unterdruck anlegen: 35 mbar für 20 min (ständig mit Puffer bedeckt halten)
- Restlichen Puffer mit Spritze abnehmen
- Überschichten des Gels mit Transferpuffer (= Neutralisierungspuffer)
- Unterdruck anlegen: 45 mbar für 20 min (ständig mit Puffer bedeckt halten)
- Restlichen Puffer mit Spritze abnehmen
- Apparatur auseinanderbauen
- Nylonmembran im UV-Crosslinker fixieren (Auto Cross Link = 120 mJ)

Blocking Stock Solution: Blocking Reagenz 10 % (w/v) in Puffer1
unter Rühren Erhitzen
Autoklavieren
Lagerung bei 4 °C

Standardhybridisierungslösung (ohne Formamid):	SSC	5 x
	Blocking Reagenz	1 %
	N-Laurylsarcosin	0,1 %
	SDS	0,02 %
	<i>Lagerung bei RT</i>	

Puffer-2: Blocking Stock Solution 1:10 (v/v) in Puffer-1

Farblsg.:	NBT Lsg. (75 mg/ml in DMF)	45 µl
	X-Phosphat Lsg. (50 mg/ml in DMF)	35 µl
	Puffer-3	ad 10 ml

- Prähybridisierung:
 - Nylonmembran + 20 ml Standardhybridisierungslsg. (ohne Formamid)
 - + 500 µl Heringssperma DNA (10 mg/ml)
- Inkubation : 65-68 °C für 30 min (Roller)
- Lsg. Abgießen
- Hybridisierung:
 - Nylonmembran + 20 ml Standardhybridisierungslsg. (ohne Formamid)
 - + 20 µl DIG markierte Sonde

- Inkubation : 65-68 °C; üN (Roller)
- Waschen der Nylonmembran:
 - > zweimal je 5 min bei RT mit: 2,0 x SSC; 0,1 % SDS (Roller)
 - > zweimal je 15 min bei 68 °C mit: 0,1 x SSC; 0,1 % SDS (Roller)

(Aufbewahren der feuchten Nylonmembran in dieser Phase möglich)

- Nylonmembran mit Puffer-1 waschen
- Nylonmembran mit ca. 20 ml Puffer-2 für 30 min bei RT inkubieren (Roller)
- Antikörperkonjugat 1:10.000 in Puffer-2 verdünnen (Endvolumen ca. 20 ml)
- Nylonmembran mit ca. 20 ml des verd. Antikörperkonjugates für 30 min bei RT inkubieren (Roller)
- Waschen der Nylonmembran: zweimal je 15 min bei RT mit je 20-50 ml Puffer1
- Nylonmembran mit ca. 20 ml Puffer-3 für 5 min bei RT inkubieren (Roller)

(Während dieser Inkubationszeit wird die Farblsg. frisch angesetzt.)

- Nylonmembran mit ca. 20 ml Farblsg. in Plastikfolie einschweißen
- Im Dunkeln bei RT inkubieren (erste Kontrolle nach ca. 2 h), ggf. üN oder sogar länger
- Stoppen der Rkt. durch Waschen der Nylonmembran mit A. bidest.
- Dokumentation mittels Geldokumentationsanlage, Fotokopierer oder Flachbettscanner
- Aufbewahrung: in Folie eingeschweißt (feucht, am besten in TE Puffer), im Dunkeln, bei 4 °C

2.18.3. Kartierung des Genoms von *B. japonicum*

Die physikalische Kartierung des Genoms von *B. japonicum* wurde von Prof. Dr. J. P. Tomkins und seinen Kollegen am Clemson University Genomics Institute in Clemson (USA) durchgeführt.

Sie erfolgte durch die die physikalische Kartierung einer Genbank von Bacterial Artificial Chromosomes (BAC) mittels fingerprinting mit *Hind*III und die Anordnung der Klone in Contigs, sowie die Hybridisierung dieser BACs mit Sonden bekannter DNA-Fragmente. Methoden und Resultate wurden durch Tomkins *et al.* (Tomkins *et al.*, 2001) publiziert.

2.19. Herstellung kompetenter Zellen

Die Transfektion von Bakterienzellen durch gereinigte DNA war ein wichtiger Bestandteil der genetischen Arbeiten. Methoden für die Modifizierung von Bakterien, um die Aufnahmefähigkeit für DNA zu verbessern bzw. zu generieren, wurde vielfach beschrieben (Mandel *et al.*, 1970; Dubnau *et al.*, 1971; Morrison, 1977).

Um eine möglichst hohe Ausbeute kompetenter Zellen zu erzielen, wurden alle verwendeten Reaktions- und Inkubationsgefäße sowie die Pipetten auf Eis vorgekühlt.

Die eingesetzten Bakterienstämme wurden verschiedenen Behandlungen unterzogen, um sie in den Zustand der Kompetenz zu versetzen und als kompetente Zellen zu lagern. Die Lagerung erfolgt in Form von Glycerin Kulturen bei ca. $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.19.1. Calciumchlorid kompetente Zellen

E.coli:

- Vorkultur in 5ml PA-Medium ü.N. bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aerob anziehen
- 250 ml PA-Medium 1:50 (v/v) mit der Vorkultur animpfen
- Flüssigkultur bis zu einer OD_{578} von 0,5-0,6 bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aerob anziehen (Inkubationsdauer ca. 2-2,5 h)
- Flüssigkultur bei ca. 6.500 g für 6 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugieren
- Überstand vollständig verwerfen, Pellet in 62,5 ml eiskaltem 0,1 M MgCl_2 suspendieren
- Suspension bei ca. 6.500 g für 6 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugieren
- Überstand vollständig verwerfen, Pellet in 30 ml eiskaltem 0,1 M CaCl_2 suspendieren
- Suspension auf Eis für 30 min inkubieren
- Suspension bei ca. 4.500 g für 6 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugieren
- Überstand vollständig verwerfen, Pellet in 8,5 ml eiskaltem 0,1 M CaCl_2 suspendieren
- 1,5 ml eiskaltes Glycerin zugeben, vollständig mischen
- Suspension in Aliquots von 300 μl bzw. 500 μl in gekühlte Eppendorf Reaktionsgefäße füllen
- Eppendorf Reaktionsgefäße direkt auf $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ überführen und dort bis zum Gebrauch lagern

Rhizobien:

- Vorkultur in 10 ml PSY-Medium 7 d bei 28 °C aerob anziehen
- 50 ml PSY-Medium 1:50 (v/v) mit der Vorkultur animpfen
- Flüssigkultur bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5-0,6 bei 28 °C aerob anziehen

(Inkubationsdauer ca. 5 d)

- Flüssigkultur bei ca. 6.500 g für 6 min bei 4 °C zentrifugieren
- Überstand vollständig verwerfen, Pellet in 20 ml eiskaltem 0,1 M MgCl₂ suspendieren
- Suspension bei ca. 6.500 g für 6 min bei 4 °C zentrifugieren
- Überstand vollständig verwerfen, Pellet in 20 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ suspendieren
- Suspension auf Eis für 30 min inkubieren
- Suspension bei ca. 4.500 g für 6 min bei 4 °C zentrifugieren
- Überstand vollständig verwerfen, Pellet in 3,5 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ suspendieren
- 1,0 ml eiskaltes Glycerin zugeben, vollständig mischen
- Suspension in Aliquots von 300 µl bzw. 500 µl in gekühlte Eppendorf Reaktionsgefäße füllen
- Eppendorf Reaktionsgefäße direkt auf -75 °C überführen und dort bis zum Gebrauch lagern

2.19.2. elektrokompetente Zellen

Die Anzucht der Bakterienkultur erfolgte entsprechend der für die Herstellung der Calciumchlorid kompetenten Zellen (2.19.1.).

- Bakterienkultur 10 min auf Eis inkubieren
- Suspension bei ca. 6.500 g für 6 min bei 4 °C zentrifugieren
- Überstand vollständig verwerfen, Pellet in 100 ml eiskaltem A. bidest. suspendieren
- Suspension bei ca. 6.500 g für 6 min bei 4 °C zentrifugieren
- Überstand vollständig verwerfen, Pellet in 1 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin suspendieren
- Suspension zu je 50 µl in Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotieren und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefrieren

} zweimal
wiederholen

Die Zellen wurden anschließend bei -75 °C gelagert.

2.20. Transformation

2.20.1. Transformation Calciumchlorid kompetenter Zellen

Pro Transformationsansatz wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und sofort, nachdem sie aufgetaut waren, eingesetzt.

Zu 1-10 µl der zu transformierenden DNA-Lsg. wurden 100 µl der kompetenten Zellen gegeben und vorsichtig durchmischt. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 min (während dieser Zeit sollte die Anlagerung der Fremd-DNA an die kompetente Zelle erfolgen) und anschließend wurden die Ansätze für 2 min in ein Wasserbad von 42 °C überführt (dieser Temperaturschock sollte zur Aufnahme der Fremd-DNA in die kompetente Zelle führen).

Daraufhin wurde 1 ml Voll-Medium (*E. coli*: LBG, Rhizobien: PSY) zu dem Transformationsansatz gegeben und es folgte eine aerobe Inkubation unter optimalen Wachstumsbedingungen für etwa die Dauer einer Verdopplungszeit (*E. coli*: 37 °C für 30-60 min, Rhizobien: 28 °C für 1-3 d). Von dieser Flüssigkultur wurden 100 µl direkt auf selektivem Nähragar ausplattiert. Die verbliebene Flüssigkultur wurde in der Tischzentrifuge bei ca. 22.000 g für 30 s zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Rücklauf suspendiert. Diese konzentrierte Bakteriensuspension wurde nun auch auf selektivem Nähragar ausplattiert (bei dem standardmäßigen Verfahren wurde auf der gesamten Nähragarplatte die direkt entnommene Kultur und auf einer Hälfte derselben Nähragarplatte zusätzlich die ankonzentrierte Bakteriensuspension verteilt). Die darauffolgende Inkubation bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 28 °C (Rhizobien), die zur Anzucht der Transformanten diente, dauerte 12-36 h (*E. coli*) bzw. 5-10 d (Rhizobien).

2.20.2. Transformation elektrokompetenter Zellen (Elektroporation)

Für die Elektroporation wurden auf Eis 2–5 µl der DNA-Lsg. mit 50 µl elektrokompetenten Zellen gemischt und in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette 2 mm (BIOzym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) gefüllt. Die Elektroporation erfolgte direkt mit Hilfe des Pulse Controller und des Gene Pulser™ bei 2,0 V sowie 200 Ohm und 25 µFD.

Dieser Transformationsansatz wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit 1 ml LBG-Medium überführt, bei 37 °C für 1 h inkubiert und anschließend auf selektiven PA-Medium Agarplatten ausplattiert (siehe 2.20.1.), die bei 37 °C ü.N. inkubiert wurden.

2.21. Konjugation

Bei der Konjugation wurden mobilisierbare Hybridplasmide (z.B. basierend auf pNVmob, pK18mob, etc.) von dem Donor Stamm *E. coli* S17-1 (die *tra* Gene sind im Genom dieses Stammes integriert) in einen ausgewählten *B. japonicum* Rezipienten Stamm übertragen. Die Donoren wurden selektiv in PA-Medium bis zur logarithmischen Phase ($OD_{600} = 0,4-0,5$) angezogen, die Rezipienten in PSY-Medium bis zum Ende der logarithmischen Phase ($OD_{600} = 1-3$).

Für die Kreuzung wurden die Kulturen in einem Verhältnis von 1 : 10 (Donor : Rezipient) in einem 2 ml Eppendorf Cup gemischt und bei RT in einer Tischzentrifuge pelletiert (maximale Geschwindigkeit für 2 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Rücklauf suspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf eine 20E-Medium Agarplatte getropft und diese bei 28 °C inkubiert. Nach 3 d wurde die Kultur mit steriler 0,9 %iger NaCl Lsg. abgespült und suspendiert. Jeweils 100 µl verschiedener Verdünnungsstufen (Standard: 10^0 , 10^{-3} , 10^{-5}) dieser Suspension wurden auf selektiven PSY-Medium Agarplatten ausplattiert. Diese Agarplatten wurden für ca. 10 d bei 28 °C inkubiert. Die erhaltenen Einzelklone wurden auf selektive PSY-Medium Agarplatten und Kongorot (25 mg/l) enthaltende PSY-Medium Agarplatten übertragen (parallelstochern) und wiederum bei 28 °C inkubiert. Die Kongorot enthaltenden PSY-Medium Agarplatten dienen zur Unterscheidung von *E. coli* und *B. japonicum*, da sich *E. coli* Kolonien darauf rot färben während *B. japonicum* Kolonien weiß bleiben.

2.22. Sequenzierung

2.22.1. Sequenzierreaktion mit Hilfe der PCR

Die Reaktionsmische des verwendeten Thermo Sequenase cycle sequencing kit enthalten: Tris-HCl (pH 9,5), Magnesiumchlorid, Tween™20, Nonidet™ P-40, 2-Mercaptoethanol, dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP, ddNTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase (*Lagerung bei -20 °C*)

→ in den jeweiligen Reaktionsmischen enthaltene ddNTPs:

A-Reagenz:	ddATP
C-Reagenz:	ddCTP
G-Reagenz:	ddGTP
T-Reagenz:	ddTTP

Stop-Solution:	Formamid	95 % (v/v)
	EDTA	25 mM
	Bromphenolblau	0,0625 % (w/v)

Lagerung bei -20 °C

diese Stop-Solution konnte direkt eingesetzt oder mit der vom Hersteller des Kits beigefügten Stop-Solution 1:2 gemischt werden

Beste Ergebnisse wurden mit dem Sequi Therm™ Stop/Gel Loading Buffer For LiCor® von Epicentre Technologies (Madison, WI [USA]) erreicht.

Die DNA-Konzentration des eingesetzten Templates sollte pro kb ca. $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ betragen. Damit wurde erreicht, daß im Reaktionsansatz eine DNA-Menge von ca. $0,9 \text{ pmol} \cdot \text{kb}^{-1}$ vorhanden war. Diese Menge hatte sich in den Vorversuchen als sehr effektiv erwiesen. Die verwendeten Komponenten wurden auf Eis aufgetaut und auch während der weiteren Vorbereitung und Mischung ständig auf Eis gehalten. Die Reaktionsansätze selbst wurden bei RT gemischt und angesetzt, wenn die Sequenzierreaktion direkt anschließend erfolgte.

Die Sequenzierreaktion basierte prinzipiell auf der Methode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

Zunächst wurden in einem Vorlagegefäß $14,0 \mu\text{l}$ template DNA und ca. 2 pmol (ca. $1,0 \mu\text{l}$ Lsg.) der fluoreszenzmarkierten Primer zusammengegeben und gründlich gemischt (optional zusätzlich $1,0 \mu\text{l}$ DMSO, z.B. bei templates mit hohem GC Anteil oder starken Sekundärstrukturen). In die farblich unterschiedlichen Reaktionsgefäße wurde parallel je $1,0 \mu\text{l}$ des jeweiligen Reaktionsmixes gegeben. Aus dem Vorlagegefäß wurden nun je $3,5 \mu\text{l}$ in ein Reaktionsgefäß überführt und mit dem vorhandenen Reaktionsmix vermischt.

Diese Reaktionsansätze wurden dem folgenden PCR Programm unterzogen:

Beginn:	vollständige Denaturierung:	94 °C	3 min
Hauptprogramm:	30 Zyklen des PCR Abschnittes:		
	Denaturierung:	94 °C	20 s
	Annealing:	62 °C	30 s
	Extension:	72 °C	40 s
Abschluß:	zusätzliche Extension:	72 °C	4 min

Nachdem das Programm vollständig abgelaufen war, hielt der Thermocycler die Proben bis zur Entnahme auf konstant 4 °C.

Anschließend wurden zu jedem Reaktionsansatz 3,0 µl der Stop-Solution gegeben.

Die Lagerung der fertigen Proben erfolgte möglichst dunkel bei 4 °C oder -20 °C.

2.22.2. Herstellung des Polyacrylamidgels für die elektrophoretische Auftrennung

Die beiden Glasplatten wurden mit heißem Wasser abgewaschen und getrocknet. Durch anschließendes Abreiben mit 96 % EtOH wurden die verbliebenen Feuchtigkeitsreste entfernt. Wenn die Platten schlierenfrei sauber und trocken waren, wurden sie mit einem möglichst fusselfreien Tuch abgewischt und die Gelapparatur wurde zusammengebaut.

Das Polyacrylamidgel wurde aus Fertiglösungen hergestellt. Zu diesem Zweck wurden 24 ml Sequagel™ XR mit 6 ml Sequagel™ complete vorsichtig (ohne Luftblasen einzutragen) vermischt.

Von der so entstandenen Gellösung wurden 3 ml entnommen und mit 30 µl 10 %iger (w/v) wässriger APS-Lsg. versetzt. Mit dieser Lsg. wurde von unten her ein kurzes Stück Gel in der vertikal aufgebauten Apparatur gegossen, dieses Gelstück fungierte beim eigentlichen Gießen als Dichtung. Nach einer Inkubation bei RT für ca. 20 min war das Gelstück vollständig polymerisiert.

Die restliche Gellösung wurde mit 280 µl der 10 %igen (w/v) APS-Lsg. versetzt und gründlich durchmischt. Der Gelträger wurde der Halterung entnommen und schräg festgehalten. Die Gellösung wurde daraufhin mittels einer 50 ml Spritze mit einem aufgesetzten Einmal-Filterhalter (Porengröße 0,2 µm) langsam zwischen die Glasplatten gespritzt. Anschließend wurde das Gel zur Polymerisation horizontal gelagert und der Spacer zur Aussparung des Bereiches für den Kamm angebracht.

Die gesamte Apparatur mußte möglichst erschütterungsfrei bei RT für mindestens 2 h gelagert werden, um ein vollständiges und gleichmäßiges Polymerisieren zu gewährleisten.

2.22.3. Polyacrylamid Gelelektrophorese unter Verwendung des LI-COR DNA-Sequencers

Die Handhabung des DNA-Sequencers erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers. Vor dem Stecken des Kamms wurde der ausgesparte Bereich gründlich gereinigt und vollständig von Gelstücken und auskristalisiertem Harnstoff befreit. Der verwendete „sharktooth“ Kamm bildete 64 Taschen über der Gelfront, so daß maximal 16 Sequenzierungen, also insgesamt 64 Reaktionen, gleichzeitig aufgetrennt und ausgewertet werden konnten.

Abhängig von der Qualität der Reaktionen wurden pro Tasche jeweils 0,5-1,8 µl eines Reaktionsansatzes aufgetragen.

Als Laufpuffer diente TBE-Puffer.

Die Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte unter definierten Bedingungen:

1500 V
20-35 mA
30-31,5 W
50 °C

Die DNA-Fragmente wurden aufgrund der Fluoreszenzmarkierung der eingesetzten Primer von dem DNA-Sequencer mittels eines Laserscanners detektiert.

2.22.4. Auswertung der Sequenzdaten

Zur Auswertung wurde zunächst das vom DNA-Sequencer aufgenommene und gespeicherte Gelbild mit der vom DNA-Sequencer ermittelten Nukleotidsequenz verglichen, um etwaige Lesefehler zu korrigieren.

Die so erhaltene Nukleotidsequenz wurde unter Verwendung der Computerprogramme Word (Microsoft Corporation, Redmond [USA]), Genmon 4.3 (GBF, Braunschweig), GeneCompar 1.3 und GeneBase 1.0 (beide von Applied Maths, Kortrijk [B]) sowie PC Gene (IntelliGenetics Inc., Mountain View [USA]) ausgewertet. Zusätzlich wurden verschiedene Programme und Datenbanken genutzt, die über das Internet frei zugänglich sind, die Adressen wurden an den entsprechenden Stellen im Text angegeben.

Bei der Auswertung war sowohl die Basensequenz als auch die abgeleitete AS-Sequenz und mögliche strukturelle Besonderheiten der resultierenden Genprodukte von Interesse.

Für die Analyse der potentiellen mRNA, bezüglich möglicher Sekundärstrukturen und deren Bindeenergie, diente das Programm mfold in den Versionen 2.3 und 3.0 nach Zuker und Turner (Zuker *et al.*, 1991; Walter *et al.*, 1994), die auf folgender homepage im Internet zur Verfügung gestellt werden:

<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/>

Die aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten AS-Sequenzen aller sechs möglichen Leserahmen wurden mit bereits bekannten AS-Sequenzen der Datenbanken GenBank, EMBL, DDBJ und PDB des National Center for Biotechnology (NCBI) in Bethesda (USA) verglichen. Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe der NCBI internen Programme blastx, blastn und blastp durchgeführt, die die statistischen Methoden von Karlin und Altschul (Karlin *et al.*, 1990; Karlin *et al.*, 1993) nutzen. Der Datenaustausch erfolgte via Internet.

2.23. Vektorintegrationsmutagenese

Bei der Vektorintegrationsmutagenese (VIM) wurden entsprechende DNA-Fragmente in mobilisierbare Vektoren kloniert und diese dann mittels Konjugation in den zu mutierenden *B. japonicum* Stamm transferiert. Anschließend erfolgte eine Selektionierung auf die im Vektor kodierte Antibiotikum Resistenz.

Da die verwendeten Vektoren in *B. japonicum* nicht stabil sind, konnte die zusätzliche Resistenz nur durch Integration ins Genom erreicht werden. Diese Integration erfolgte üblicherweise durch einfache Rekombination des Insert Fragmentes mit dem homologen DNA-Bereich im Genom des Rezipienten. Infolge der gerichteten Integration des Vektors in das Genom wurde die Expression des betroffenen Gens an dieser Stelle unterbrochen.

2.24. Reportergenfusion

2.24.1. Verwendung von *lacZ* als Reportergen

Das Gen *lacZ* ist ein Teil des *lacZ* Operon und kodiert die β -Galactosidase (Craven *et al.*, 1965). Die β -Galactosidase ist im Cytoplasma der Zelle aktiv, die Expression kann durch Zugabe von IPTG zum Medium induziert werden (Pardee *et al.*, 1959; Zabin *et al.*, 1970). Aktive β -Galactosidase setzt im Enzym-Test das lösliche und farblose Substrat X-Gal in das unlösliche Produkt 55'-Dibrom-44'-Dichlorindigo um, dessen blaue Färbung im Substrat klar identifiziert werden kann (Horwitz *et al.*, 1966).

Alternativ wird das als Substrat eingesetzte ONPG in Galaktose und o-Nitrophenol gespalten, das o-Nitrophenol ist gelb und kann bei OD₄₂₀ photometrisch bestimmt werden (Miller, 1972).

In den dargestellten Versuchsreihen wurde der Vektor pUC18 verwendet, um das Durchlesen von DNA-Fragmenten in *E. coli* zu belegen.

Der Vektor pUC18 trägt unter anderem den *lacZ* Promotor, der die Expression reguliert und die Induktion mittels IPTG ermöglicht. Von bp 216 bis bp 536 kodiert der Vektor die ersten 107 AS des *lacZ* Gens, das *lacZ* α -Fragment, daher konnte die Expression von aktiven β -Galactosidase Molekülen nur in einem α -komplementierenden Bakterienstamm erfolgen, zu diesem Zweck wurden die Analysen in *E. coli* DH5 α durchgeführt.

Bei den Klonierungen wurde ein DNA-Fragment der Multiple Cloning Site (mcs) des Vektors durch ein anderes DNA-Fragment ersetzt, dieser Austausch erfolgte ca. 30 bp downstream des ATG Startcodon.

Wenn der DNA-Austausch so erfolgte, daß das anschließende *lacZ* Fragment mit dem *lacZ* Startcodon in frame war, konnte über die Aktivität der β -Galactosidase die Translation des *lacZ* α Fragmentes und damit das Überlesen des eingefügten DNA-Fragmentes dokumentiert werden (siehe 2.25.), es handelte sich in diesem Fall um eine translationale Fusion.

Die Intensität der Blaufärbung durch das Produkt der X-Gal Umsetzung konnte photometrisch bei 650 nm gemessen werden, und damit wurde auf die Menge der exprimierten Fusionsproteine geschlossen.

2.24.2. Verwendung von '*phoA* als Reportergen

Der Einsatz von *phoA*, dem Gen der alkalischen Phosphatase, als Reportergen bei Fusionen, diente zur Identifizierung und Lokalisierung periplasmatischer Genprodukte und der sie kodierenden DNA-Bereiche (Silver *et al.*, 1987; Traxler *et al.*, 1992; Barny *et al.*, 1996).

Die alkalische Phosphatase ist aktiv, wenn sie außerhalb des Cytoplasma der Zelle vorliegt (Michaelis *et al.*, 1983; Manoil *et al.*, 1986), das Genprodukt des eingesetzten Reportergens '*phoA* kann allerdings nur durch die Cytoplasmamembran transportiert werden, wenn es an ein anderes Genprodukt gekoppelt ist, das entsprechende Signale für ein Ausschleusen trägt (z.B. Signalpeptid).

Die alkalische Phosphatase setzt im Enzym-Test das lösliche und farblose Substrat X-P in einen unlöslichen Indigo-Farbstoff um, dessen blaue Färbung im Substrat klar identifiziert werden kann (Payne *et al.*, 1991). Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten, das von der Phosphatase freigesetzte 5-Bromo-4-Chloro-Indoxyl reagiert spontan mit Sauerstoff zu dem unlöslichen Indigo-Farbstoff, wahlweise können auch andere Elektronenakzeptoren eingesetzt werden, wie z.B. NBT, das bei der Färbung der Southern Blots verwendet wird (siehe 2.18.).

Das eingesetzte Gen *'phoA* war ein Teil des Transposon *Tn_{phoA}*, ein Derivat des Transposon *Tn5* (Manoil *et al.*, 1985), und gelangte durch ungerichtete Transposition ins Genom des Zielorganismus. Bei den selektierten Ereignissen, in denen die Expression einer aktiven alkalischen Phosphatase stattfand, handelte es sich um translationale Fusionen, wie bereits in anderen Untersuchungen beschrieben (Knecht *et al.*, 1984; Ey *et al.*, 1986).

2.25. Messung der Expression von Reportergenfusionen in Bakterien Kulturen

2.25.1. *In vitro* Messung der β -Galactosidase Aktivität von Flüssigkulturen

Die Messung der β -Galactosidase Aktivität in Flüssigkulturen wurde basierend auf der Beschreibung von Miller (1972) durchgeführt. Als Substrat diente ONPG, es wurde von der β -Galactosidase umgesetzt, resultierend in einem gelben Farbstoff.

Lsg. A:	ONPG	40 mg
	0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0)	10 ml

- aerobe Anzucht der Bakterienstämme in LB-Medium bei 37 °C (Dauer unterschiedlich)
- Inkubation auf Eis für 1 h
- Messung der OD₆₀₀ der Bakterienkulturen, gemessen gegen LB-Medium
- pro Ansatz wurde in einem Rg vorgelegt:

Lsg. A	1,5 ml
0,1 %ig SDS	1 Tropfen
Chloroform	2 Tropfen
- Zugabe von jeweils 0,5 ml Bakteriensuspension zum Reaktionsansatz, Mischen durch kurzes starkes Schütteln (Starten der Reaktion)

- Inkubation bei 28 °C im Dunkeln (bis zur Gelbfärbung der Reaktionsansätze)
- Stoppen der Reaktion durch Zugabe von je 1 ml 1 M Natriumcarbonat, Mischen durch kurzes starkes Schütteln
- Messung der OD₄₂₀ und OD₅₅₀, gemessen gegen einen Referenzansatz ohne Bakterien (Zugabe von LB zum Reaktionsansatz)

Berechnung der β -Galactosidase Aktivität:

$$U = [1000 \cdot (OD_{420} - 1,75 \cdot OD_{550})] / (t \cdot v \cdot OD_{600})$$

2.25.2. *In vivo* Messung der β -Galactosidase Aktivität in *E. coli*

Flüssigkulturen

Die Messung der β -Galactosidase Aktivität von Flüssigkulturen *in vivo* erfolgte unter der Verwendung von X-Gal als Substrat, dessen Umsetzung photometrisch bestimmt wurde.

Die Bakterienklone wurden von selektiven PA-Medium Agarplatten in je 5 ml flüssiges Vollmedium überimpft. Dem Medium wurden 100 mg·l⁻¹ IPTG und 50 mg·l⁻¹ Ap (alle Derivate basierten auf pUC18; es wurde auf das Resistenzgen des eingesetzten Vektors selektiert) zugesetzt. Die Kulturen wurden bei 37 °C aerob ü.N. angezogen.

Von diesen Vorkulturen (VK-1) wurden jeweils 100 µl in 10 ml des gleichen Vollmediums überimpft. Dem Medium wurden 100 mg·l⁻¹ IPTG und 50 mg·l⁻¹ Ap zugesetzt. Die Kulturen wurden bei 37 °C aerob bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 1,0 angezogen.

Von diesen Vorkulturen (VK-2) wurden jeweils 20 µl in 10 ml des gleichen Vollmediums überimpft. Dem Medium wurden 100 mg·l⁻¹ IPTG und 200 mg·l⁻¹ X-Gal zugesetzt. Die Kulturen wurden bei 37 °C aerob für 24 h angezogen. Anschließend wurden diese Hauptkulturen (HK) bei RT für 14 d inkubiert.

Die Auswertung der Expressionshöhe erfolgte durch photometrische Messung der umgesetzten Menge X-Gal:

- 1 ml Bakteriensuspension abzentrifugieren (Tischzentrifuge, 10000 rpm, 30 s)
- Überstand (ÜS) in Küvetten für das Photometer überführen,
Absorption bei $\lambda = 650$ nm gegen das Medium messen (Wert = ÜS-OD₆₅₀)
- Pellet zweimal mit 0,85 % NaCl waschen
- Pellet in 1 ml 0,85 % NaCl suspendieren (P),
Absorption bei $\lambda = 600$ nm gegen 0,85 % NaCl messen (Wert = P-OD₆₀₀)

- optional: Verdünnungsreihe der Bakteriensuspension herstellen und verschiedene Verdünnungsstufen auf selektiven PA-Medium Agarplatten ausplattieren (Bestimmung der LZZ)

Zum Vergleich der verschiedenen Klone wurde die Aktivität der β -Galactosidase als $(\text{ÜS-OD}_{650} / \text{P-OD}_{600}) \cdot 100$ dargestellt, dieser Wert wurde mit U_x bezeichnet.. Der Wert von *E. coli* DH5 α ohne zusätzliches Plasmid wurde als 0 festgesetzt.

2.25.3. *In vitro* Messung der alkalischen Phosphatase Aktivität

Die alkalische Phosphatase Aktivität von Bakterienkulturen, angezogen in Flüssigmedium, wurde wie durch Manoil (1985) beschrieben durchgeführt.

2.25.4. Optische Differenzierung der Reportergenexpression von Bakterienkolonien auf Agarplatten

Für den Vergleich der *E. coli* DH5 α Klone mit den verschiedenen Hybridplasmiden für die Reportergenfusion mit *lacZ* wurden die Flüssigkulturen VK-2 aus 2.25.2 verwendet.

Jeweils 20 μ l oder 50 μ l dieser Kulturen wurden auf unselektive PA-Medium Agarplatten mit 80 mg X-Gal pro Liter Medium aufgetropft.

Die Inkubation der Platten erfolgte zuerst bei 37 °C für 24 h und anschließend bei RT für 14 d.

Für den Vergleich von *B. japonicum* Klonen bezüglich ihrer alkalischen Phosphatase Aktivität wurden Flüssigkulturen in 20E-Medium bis zur späten logarithmischen Phase angezogen (aerob bei 28 °C).

Jeweils 20 μ l oder 50 μ l dieser Kulturen wurden auf unselektive 20E-Medium Agarplatten mit 40 mg X-Phosphat pro Liter Medium aufgetropft.

Die Inkubation der Platten erfolgte zuerst bei 28 °C für 7 d unter verschiedenen atmosphärischen Bedingungen (aerob oder mikroaerob).

Abschließend wurden die Bakterienkulturen mit Hilfe einer Digitalkamera (Olympus C-2500 L) dokumentiert und digitalisiert.

Die Intensität der Blaufärbung (resultierend aus der Höhe der Enzymaktivität) konnte mit Hilfe des menschlichen Auges differenziert werden. Daraus resultierten zwar keine absoluten Werte aber es konnten relative Zusammenhänge eindeutig erkannt werden. Dies war für die weitere Versuchsdurchführung von ausschlaggebender Bedeutung.

2.26. Überexprimierung von potentiellen Genen mit Hilfe des QIAGEN Expressions Systems

Die Überexprimierung von *B. japonicum* ORFs in *E. coli* erfolgte mit dem QIAexpress Kit, basierend auf den Angaben des Herstellers. Für die Durchführung der Versuche wurde die Beschreibung „The QIAexpressionist“ von 03/97 verwendet.

Die Anzucht erfolgte bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5. Anschließend wurde die Expression durch IPTG Zugabe induziert und die Zellen wurden weiter bei 30 °C üN angezogen. Die Zellen wurden daraufhin geerntet und die Proteine wurden nach Worrall (Worrall, 1996) extrahiert. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE unter nicht denaturierenden Bedingungen in einem SDS-PAG mit 15 % Acrylamid.

2.27. Inkorporation von radioaktivem [⁷⁵Se]-Selenit in wachsende Bakterienkulturen

- Anzucht einer Vorkultur von selektiver Vollmedium Agarplatte in Vollmedium (angereichert mit Cys und Met)

B. japonicum: in 10 ml 20E mit Cys 300 mg·l⁻¹ und Met 300 mg·l⁻¹

E. coli: in 5 ml LB mit Cys 100 mg·l⁻¹

- Die Inkubation erfolgte aerob (Rg auf Roller)

B. japonicum: bei 28°C für 6d

E. coli: bei 37°C ü.N.

- Animpfen der Hauptkultur: OD₆₀₀ der Vorkultur messen und ein definiertes Volumen der Vorkultur in Vollmedium (angereichert mit Cys und Met) überführen, so daß die Hauptkultur eine OD₆₀₀ ≈ 0,1 hat

B. japonicum: in 10 ml 20E mit Cys 300 mg·l⁻¹ und Met 300 mg·l⁻¹

E. coli: in 5 ml LB mit Cys 100 mg·l⁻¹

- Die Inkubation erfolgte aerob (50 ml Schott Flasche auf Schüttler, bei 110 rpm), mikroaerob (in einer dichten 50ml Flasche mit 5 % Luft und 95 % N₂ Atmosphäre; d.h. die O₂ Konzentration lag bei ca. 1 %) oder anaerob (Standkultur in einer 50 ml Schott Flasche im Inkubator)

B. japonicum: bei 28°C

E. coli: bei 37°C

- Zugabe von Na-[⁷⁵Se]-Selenit (0,94 mM; ⁷⁵Se: 17 µCi·µl⁻¹) bei einer definierten OD₆₀₀
 - B. japonicum*: Zugabe von 15 µl Na-[⁷⁵Se]-Selenit; bei OD₆₀₀ ≈ 0,2
 - E. coli*: Zugabe von 7 µl Na-[⁷⁵Se]-Selenit; bei OD₆₀₀ ≈ 0,5
(nach 5 min: Zugabe von 5 µl 100 mM IPTG Lsg.)
- Die weitere Inkubation der Hauptkultur erfolgte wie vorher
- Ernte der Zellen nach einer definierten Inkubationszeit, bei einer OD₆₀₀ ≈ 1,0
 - B. japonicum*: Ernte nach 1 d
 - E. coli*: Ernte nach 1,5-2 h; ggf. erste Ernte (t₀) mit der IPTG Zugabe

2.28. Isolierung und Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine aus Bakterienkulturen

2.28.1. Ernte, Aufschluß der Bakterienzellen und Probenvorbereitung

- 2 ml Bakteriensuspension zentrifugieren (Tischzentrifuge, 14000 rpm, 2 min)
- Überstand verwerfen
- Pellet dreimal waschen:
 - B. japonicum*: mit A. bidest
 - E. coli*: mit dem verwendeten Medium
- Pellet in 100 µl HMK-Puffer mit DNase und Proteinase K (je eine Spatelspitze pro 2 ml) suspendieren; statt HMK-Puffer konnte auch Tris-HCl pH 7,0 eingesetzt werden
- der Zellaufschluß erfolgte auf verschiedenem Wege:
 - > durch direktes Zerstören der Zellen mit Hilfe des Ultraschallfingers
 - > durch zehnmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen im Wasserbad bei 37°C
- Zentrifugieren der Proben (Tischzentrifuge, 14000 rpm, 10 min)
- Überstand abnehmen und mit gleichem Volumen 2x Probenpuffer versetzen
- Inkubation bei 95 °C für 10 min
- Zentrifugieren der Proben (Tischzentrifuge, 14000 rpm, 2 min)
- Überstand abnehmen, Lagerung bei – 20 °C

2.28.2. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) des Proteoms

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt.

Für die Auftrennung wurde ein SDS-Polyacrylamid Gel hergestellt, zusammengesetzt aus einem 4 %igen Sammelgel und einem 12,5 %igen Trenngel.

Elektrodenpuffer, 5x:	Tris Base	15 g
	Glycin	72 g
	SDS	4%
	A. bidest.	ad 1000 ml
	pH 8,3	

Sammelgel; 4 %ig:	Acrylamid Stammlsg.	1,3 ml
	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml
	A. bidest.	6,0 ml
	10 %ig SDS	100 µl
	10 %ig APS	50 µl
	TEMED	10 µl

Trenngel; 12,5 %ig:	Acrylamid Stammlsg.	13,9 ml
	1,5 M Tris-HCl pH 8,3	8,3 ml
	A. bidest.	10,6 ml
	10 %ig SDS	333 µl
	10 %ig APS	166,7 µl
	TEMED	16,7 µl

Es wurden pro Probe 15–50 µl der Probe in jeweils eine Tasche des Gels aufgetragen.

Als Größenmarker für das molekulare Gewicht wurde zusätzlich ein standardisiertes Gemisch von Proteinen bekannter Größe aufgetragen. Wahlweise wurde der kommerziell verfügbare Marker LMW (aus dem LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis von Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Buckinghamshire [GB]) eingesetzt.

Der Stromkreis wurde geschlossen und der Lauf erfolgte bei definierter Stromstärke.

Während die Proben durch das Sammelgel wanderten wurden 16 mA angelegt, beim Lauf durch das Trenngel 24 mA.

Färbelsg.:	Coomassie Brilliantblau R250	0,25 g
	Methanol	250 ml
	Essigsäure	50 ml
	A. bidest.	ad 500 ml

Entfärbelsg.:	Methanol	150 ml
	Essigsäure	50 ml
	A. bidest.	ad 500 ml

Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel in die Färbelsg. eingelegt und bei 50 °C unter leichtem Schütteln für 15 min inkubiert.

Die Entfärbung erfolgte anschließend in der Entfärbelsg. bei RT unter leichtem Schütteln bei mehrfachem Wechseln der Entfärbelsg.. Die Entfärbung konnte durch vorsichtiges Erwärmen in der Mikrowelle beschleunigt werden, der Färbungsgrad des Gels wurde in regelmäßigen Abständen auf einem Leuchtschirm kontrolliert.

Das Gel wurde nach dem Färben auf ein Filterpapier (z.B. Whatman 3MM) aufgebracht und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Wenn die Gele anschließend mittels Autoradiographie ausgewertet werden sollten, wurden sie zusätzlich in der Gel Trocknungsanlage bei 80 °C für 30 min unter Vakuum getrocknet.

2.28.3. Dokumentation des Polyacrylamidgels

Das gefärbte Gel wurde mit Hilfe eines Flachbettscanners (z.B. hp scanjet 5470c, Hewlett-Packard, Palo Alto [USA]) digitalisiert und am Computer unter Verwendung entsprechender Software (z.B. Photoshop 5.0 von Adobe, Mountain View [USA]) dokumentiert.

Gele mit radioaktiv markierten Proben wurden darüberhinaus auf eine Kodak Storage Phosphor Screen (Molecular Dynamics, Sunnyvale [USA]) aufgelegt und für mehrere Tage darauf inkubiert (bei RT im Dunkeln). Die Digitalisierung dieser Phosphorimager Platten erfolgte mit Hilfe des Storm 860 Laser Scanners (Molecular Dynamics, Sunnyvale [USA]) und die Auswertung der erlangten Daten am Computer mit den Programmen Image Quant 2.1 (Molecular Dynamics, Sunnyvale [USA]) und Photoshop 5.0 (Adobe, Mountain View [USA]).

2.29. Isolierung und Analyse der EPS von *B. japonicum*

2.29.1. Anzucht der Bakterien

Es wurde zunächst eine 10 ml Vorkultur in 20E-Medium bei 28 °C aerob (im Rg auf einem Roller) für 6 d angezogen. Mit der Vorkultur wurden 200 ml 20E 1%ig (v/v) angeimpft und bei 28 °C aerob (im Erlenmeyerkolben auf einem Horizontalschüttler bei 110 rpm) für 4 d inkubiert.

2.29.2. Gewinnung und Reinigung von bakteriellen EPS

Die Kultur wurde bei ca. 14.500 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für ≥ 5 h bei -75 °C eingefroren. Die eingefrorene Lsg. wurde nun in der Gefriertrocknungsanlage bei einer Kondensatortemperatur von -60 °C und einer Heizplattentemperatur von -10 °C bis auf einen Flüssigkeitsrest von ca. 50 ml eingetrocknet (lyophyllisiert). Die auf diesem Weg erhaltene leicht trübe Flüssigkeit wurde noch einmal bei ca. 15.000 g für 25 min bei 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und dialysiert. Bei der Dialyse wurde ein Spektra/Por® CE Dialyseschlauch mit einem MWCO von 1000 eingesetzt. Die aus der letzten Zentrifugation erhaltene flüssige Phase wurde in Aliquots von ca. 30 ml in den Dialyseschlauch gefüllt und unter ständigem Rühren für 66 h bei 4 °C gegen 3 l A. bidest. dialysiert, wobei das A. bidest. während dieser Inkubationszeit sechsmal gewechselt wurde.

Das Dialysat wurde für ≥ 5 h bei -75 °C eingefroren und in der Gefriertrocknungsanlage bei einer Kondensatortemperatur von -60 °C und einer Heizplattentemperatur von -10 °C vollständig getrocknet.

Das Produkt der Gefriertrocknung war ein Feststoff, der nun in einem adäquaten Volumen A. bidest. gelöst wurde (ca. 10 mg/ml). Diese Lsg. wurde in einem kochenden Wasserbad für 6 min inkubiert und anschließend bei ca. 15.800 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, erneut für ≥ 5 h bei -75 °C eingefroren und unter den gleichen Bedingungen wie bei der ersten Lyophyllisation gefriergetrocknet. Der entstandene Feststoff, der zum größten Teil aus EPS bestand, wurde bei -75 °C gelagert.

- Knöllchen zweimal je 15 min mit Sörensen Puffer waschen
- Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe:
 - in 30 % EtOH für 2 x 15 min
 - in 50 % EtOH für 2 x 15 min
 - in 70 % EtOH für 2 x 15 min (oder ü.N.)
 - in 80 % EtOH für 2 x 15 min
 - in 90 % EtOH für 2 x 15 min
 - in 100 % EtOH (unvergällt) für 2 x 20 min
 - in Propylenoxid für 2 x 20 min
- Imprägnierung:
 - in Propylenoxid:Epon (A+B) 1:1 (v/v) ü.N., offen unter dem Abzug
 - in Epon (A+B) mit 1,5 % DMP-30 Beschleuniger (Plano, Wetzlar) für 2 x 2 h
 - Knöllchen in Gelatinekapseln (Plano, Wetzlar) mit Epon (A+B) mit 1,5 % DMP-30 überführen
 - Knöllchen in der Spitze der Gelatinekapsel ausrichten
 - Inkubation bei 60 °C für 2 d

Die Proben wurden mit einer Rasierklinge getrimmt und dann mit dem Ultratome 8800 (LKB, Bromma [S]) geschnitten. Die ersten Schnitte wurden mit Glasklingen durchgeführt, um eine Orientierung im Objekt zu bekommen, die Schnittdicke betrug ca. 5 µm. Diese Schnitte wurden mit Richardsen Lsg. unter Hitzeeinwirkung (Brennerflamme für wenige Sekunden) angefärbt und im Lichtmikroskop betrachtet.

Anschließend wurden Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie unter Verwendung eines Diamantmessers angefertigt, die Schnittdicke betrug ca. 0,6 nm.

2.30.2. Kontrastierung der Schnitte für die Elektronenmikroskopie

Bleicitrat Lsg.:	Pb(NO ₃) ₂	1,33 g
	Na(C ₆ H ₅ O ₇) x 2 H ₂ O	1,76 g
	> 30 ml A. bidest. zugeben	
	> 1 min kräftig Schütteln	
	> 30 min stehen lassen (währenddessen mehrfach Schütteln)	
	A. bidest	ad 50 ml

Zur Nachkontrastierung (die erste Kontrastierung erfolgte durch die Behandlung mit Osmiumteroxid) wurden die Ultradünnschnitte auf Kupfernetzchen (100 mesh, Plano,

Wetzlar) aufgebracht, die mit Pioloform (Plano, Wetzlar) 0,5 % in Chloroform beschichtet waren.

Es erfolgte eine Inkubation mit in A. bidest. gesättigtem Uranylacetat für 5 min. Die Kupfernetzchen wurden daraufhin dreimal mit A. bidest. gewaschen und anschließend getrocknet.

Abschließend erfolgte eine Inkubation in alkalischer Bleicitrat Lsg. für 5 min. Die Kupfernetzchen wurden auch nach diesem Schritt dreimal mit A. bidest. gewaschen und anschließend getrocknet (die Behandlung mit Bleicitrat verstärkt die Kontrastierung von Zucker und Stärke).

2.30.3. Mikroskopie

Die Schnitte wurden im Mikroskop bei verschiedenen Vergrößerungen betrachtet.

Für die lichtmikroskopische Betrachtung wurde das Fluoreszenzmikroskop Laborlux S oder das Mikroskop Modell Orthoplan verwendet. Diese Methode ermöglichte die Betrachtung und Analyse zellulärer Strukturen.

Bei den Knöllchen-Schnitten konnten bereits erste Aussagen bezüglich der Infizierung gemacht werden.

Im Elektronenmikroskop konnten die subzellularen Strukturen genau beobachtet und analysiert werden. Bezogen auf die Symbiose konnten Aussagen über die Effizienz der Besiedlung der Knöllchen durch die Mikrosymbionten, deren Phänotyp im Knöllchengewebe und auch Veränderungen in den Pflanzenzellen gemacht werden.

2.30.4. Photographie und Bearbeitung mikroskopischer Bilder

Die Photographie im Elektronenmikroskop erfolgte unter Verwendung von SCIENTIA EM Film (AGFA, bezogen über Plano, Wetzlar).

Für die Photographie lichtmikroskopischer Schnitte wurde Ectachrome 160T Film (Kodak Limited, Hemel Hempstead [GB]) eingesetzt.

Die entwickelten Papierbilder bzw. Diapositive wurden mit Hilfe eines Flachbettscanners digitalisiert und im Computer mit entsprechender Software (z.B. Photoshop 5.0 von Adobe, Mountain View [USA]) bearbeitet, um sie anschließend in Dokumente einzufügen.

3. Ergebnisse

3.1. Verifizierung und Lokalisierung der *TnphoA* Insertion im Genom der Mutante *B. japonicum* 2-10

Die *TnphoA* Mutante *B. japonicum* 2-10, basierend auf dem WT Stamm *B. japonicum* 110*spc4*, wurde nach der Mutagenese auf Km haltigem Medium selektiert, was das Vorhandensein des Kanamycin Resistenzgens aus dem Transposon *TnphoA* im Genom von *B. japonicum* 2-10 bestätigte.

Anschließend wurde die *TnphoA*-Insertion im Genom von *B. japonicum* 2-10 durch Southern Blotting nachgewiesen, wobei die isolierte und mit Restriktions Endonukleasen zerschnittene Gesamt DNA von *B. japonicum* 2-10 mit der DIG-markierten DNA-Sonde PM7 hybridisiert wurde (Abb.04). Die Sonde PM7 war ein 1,8 kb langes DNA-Fragment, das mittels DIG-PCR aus dem Plasmid pPM7 amplifiziert wurde, das ein internes *Hind*III-*Bam*HI Fragment aus dem Transposon *TnphoA* enthält, das dessen Kanamycin Resistenzgen sowie etwa 400 bp der upstream gelegenen DNA-Region codiert.

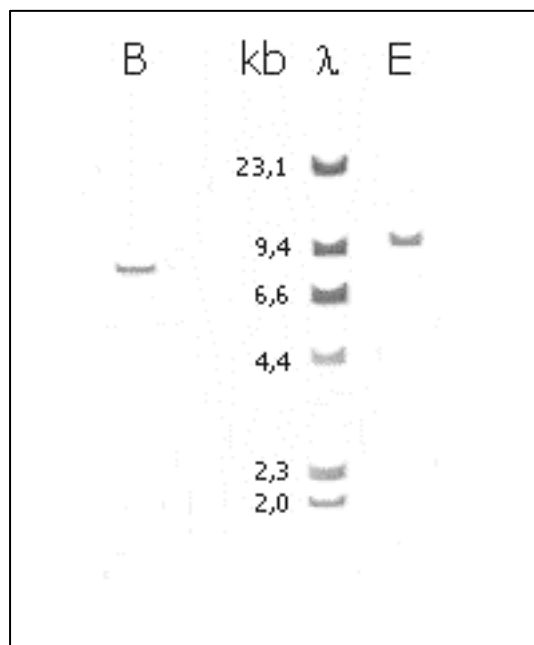


Abb.04: Southern Blot der mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnittenen Gesamt-DNA von *B. japonicum* 2-10, hybridisiert mit der DIG-markierten DNA-Sonde PM7, die das Kanamycin Resistenzgen von *TnphoA* trägt.

λ steht für *Hind*III restringierte DNA des Phagen λ, die als Längenmarker diente.

Verwendete Restriktionsenzyme: *Bam*HI (B), *Eco*RI (E)

Das Ergebnis der Hybridisierung zeigte, daß das Transposon *TnphoA* singulär im Genom der Mutante *B. japonicum* 2-10 inseriert ist. Anhand der Hybridisierungsergebnisse wurden die DNA-Fragmente der *EcoRI* und der *BamHI* Restriktion, die die Resistenzkassette des Transposons trugen, aufgrund ihrer Größe (ca. 8-10 kb) als geeignet für eine spätere Klonierung ausgewählt.

3.2. *B. japonicum* 2-10 ist in der Symbiose mit *Glycine max* stark beeinträchtigt

3.2.1. Die Phänotypen der Pflanzen in der Symbiose

Die Auswirkungen der unterschiedlich gut ausgebildeten Symbiose von *Glycine max* mit den verschiedenen Stämmen von *B. japonicum* auf die oberirdischen Pflanzenteile zeigten sich erst 28 dpi deutlich (Abb.02). Bei der Ernte der Knöllchen und dem Acetylenreduktionstest - 21 dpi - waren noch keine Unterschiede zwischen den Pflanzen, die mit unterschiedlichen Bakterienstämmen inokuliert waren und der Nullkontrolle, die nicht inokuliert war, zu erkennen.

Im Gegensatz zum WT war die Mutante *B. japonicum* 2-10 nicht in der Lage, die Sojabohne *Glycine max* bv. Maple Arrow in ausreichendem Maße in der Entwicklung zu unterstützen. Dementsprechend zeigten sich 28 dpi und 35 dpi starke Chlorosen an den Blättern der Pflanzen, die mit *B. japonicum* 2-10 inokuliert waren, darüberhinaus waren die gebildeten Früchte im Wachstum stark reduziert (Abb.05).

Am Wurzelsystem der Pflanzen zeigten sich bereits 21 dpi deutliche Unterschiede (Abb.06). Die mit *B. japonicum* 2-10 inokulierten Pflanzen hatten ein weniger stark verzweigtes Wurzelsystem als diejenigen, die mit dem WT inokuliert waren, und die durch die Mutante *B. japonicum* 2-10 hervorgerufene Nodulation der Pflanze war erheblich geringer als bei *B. japonicum* 110*spc4* (Tab.01).

Die mit dem WT inokulierten Pflanzen waren stark noduliert, während die Pflanzen mit der Mutante *B. japonicum* 2-10 entweder Nod⁻ oder nur schwach noduliert waren. Abgesehen davon waren die Wurzelknöllchen aus der Symbiose mit *B. japonicum* 2-10 auch in ihrer Größe deutlich reduziert (Tab.01).

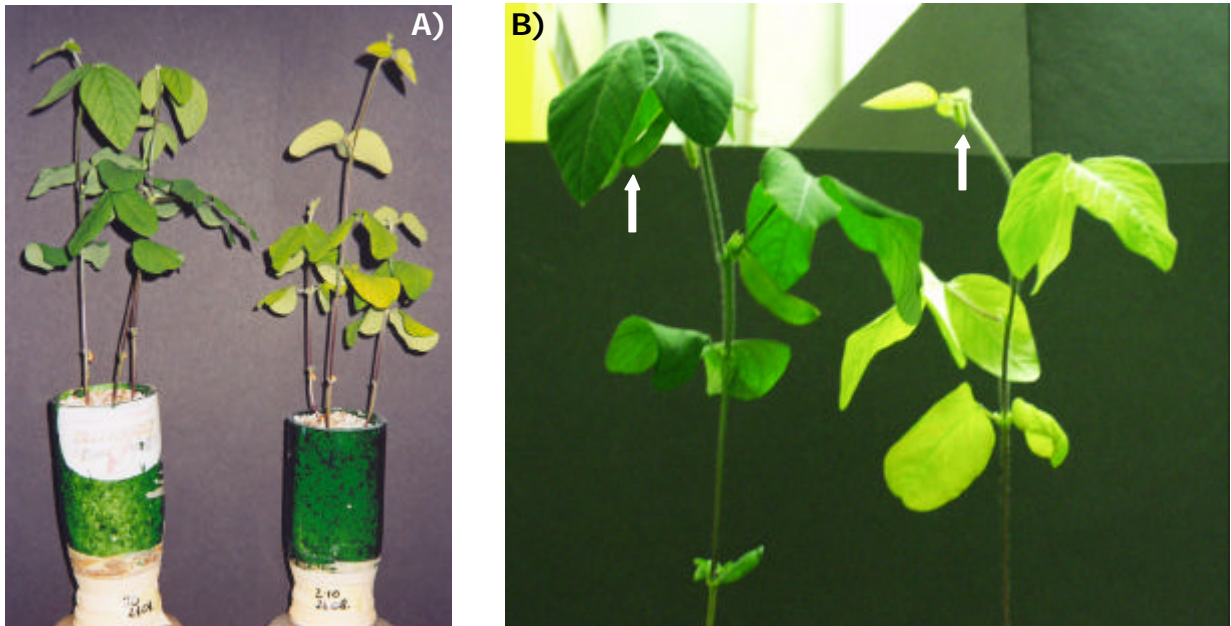


Abb.05: Oberirdische Teile von *Glycine max* cv. Maple Arrow mit *B. japonicum* 110spc4 (110) bzw. *B. japonicum* 2-10 (2-10). Die Früchte sind in (B) durch einen Pfeil gekennzeichnet.

- A) 28 dpi: Die mit *B. japonicum* 2-10 inokulierten Pflanzen trugen stark chlorotische Blätter, während die mit *B. japonicum* 110spc4 inokulierten Sojabohnen keine Beeinträchtigung in der Entwicklung aufwiesen.
- B) 35 dpi: Zusätzlich zeigte sich, daß die Früchte der mit *B. japonicum* 2-10 inokulierten Pflanzen im Wachstum stark reduziert waren.

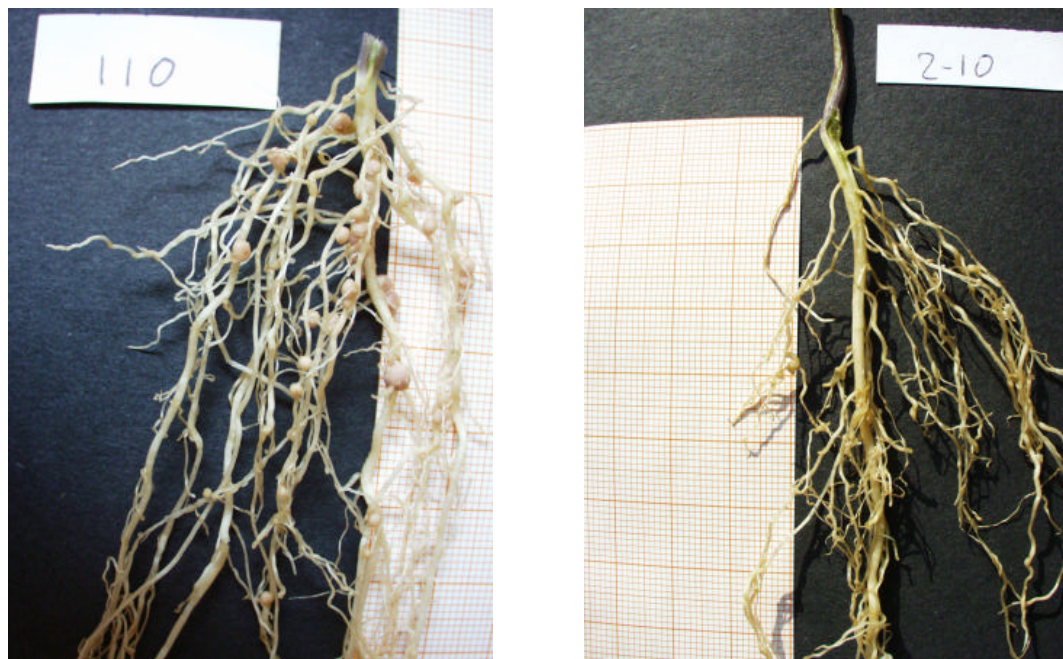


Abb.06: Unterirdische Teile von *Glycine max* cv. Maple Arrow 21 dpi mit *B. japonicum* 110spc4 (110) bzw. *B. japonicum* 2-10 (2-10). Die mit *B. japonicum* 2-10 inokulierten Pflanzen hatten ein weniger stark verzweigtes Wurzelsystem und eine verringerte Knöllchenzahl als diejenigen, die mit dem WT inokuliert waren.

<i>Glycine max</i> bv. Maple Arrow im Pflanzentest 21 dpi	Knöllchenzahl pro Pflanze	Knöllchengröße
<i>B. japonicum</i> 110spc4	31 ± 13	2,0 mm ± 1,0
<i>B. japonicum</i> 2-10	7 ± 7	1,0 mm ± 0,5

Tab.01: Dargestellt sind Größe und Anzahl der Knöllchen pro Pflanze 21 dpi, gebildet von *Glycine max* bv. Maple Arrow in der Symbiose mit *B. japonicum* 110spc4 bzw. *B. japonicum* 2-10.

Es ist der jeweilige Durchschnittswert aus mindestens fünf Versuchen angegeben, sowie die entsprechende Standardabweichung der Knöllchenzahl.

Außerdem zeigte sich beim Aufschneiden der Knöllchen von *Glycine max*, inokuliert mit *B. japonicum* 110spc4, eine deutliche rote Färbung des Gewebes im Knöllcheninneren, was auf das Vorhandensein von Leghämoglobin hindeutete. Bei dem Leghämoglobin handelt es sich um das prominenteste späte Nodulin der Pflanzenknöllchen, das für die Feinregulation der Sauerstoffkonzentration im Knöllcheninneren verantwortlich ist (Bergersen *et al.*, 1975; Marcker *et al.*, 1984). Die Knöllchen der mit *B. japonicum* 2-10 inokulierten Pflanzen hingegen waren im Inneren vollständig weiß, wodurch belegt wurde, daß kein funktionsfähiges Leghämoglobin vorlag.

3.2.2. Die N₂-Fixierungsleistung der Knöllchen

Der mit dem Wurzelsystem der Pflanzen 21 dpi durchgeführte Acetylenreduktionstest zeigte, daß die Knöllchen der Pflanzen aus der Symbiose mit *B. japonicum* 2-10 Fix waren. Die Werte unterschieden sich nicht signifikant von denen der Nullkontrolle, einer steril angezogenen Sojabohne. Dahingegen waren die Knöllchen der mit dem WT inokulierten Pflanzen zu einer starken Umsetzung von Ethin zu Ethen in der Lage, die gemessene Fixierungsleistung lag bei durchschnittlich 18 nmol C₂H₄ · h⁻¹ · mg KFG⁻¹ in dieser Symbiose.

3.2.3. Licht- und elektronenmikroskopische Analyse der Knöllchen

Bereits die Betrachtung der Dünnschnitte der Knöllchen im Lichtmikroskop ließ deutliche Unterschiede zwischen denen aus der Symbiose von *Glycine max* mit *B. japonicum* 110spc4 und denen aus der Symbiose mit *B. japonicum* 2-10 erkennen (Abb.07 und 08).

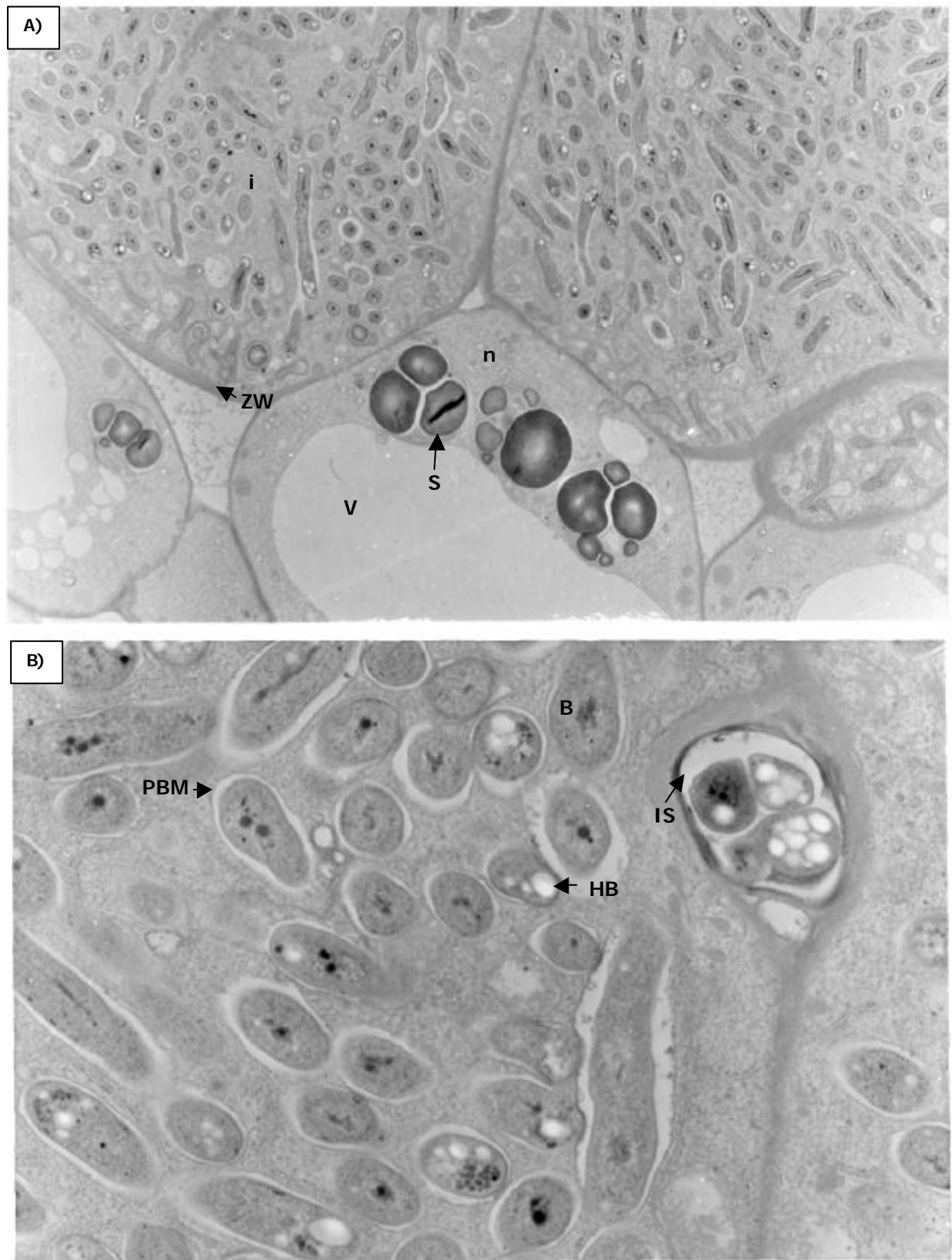
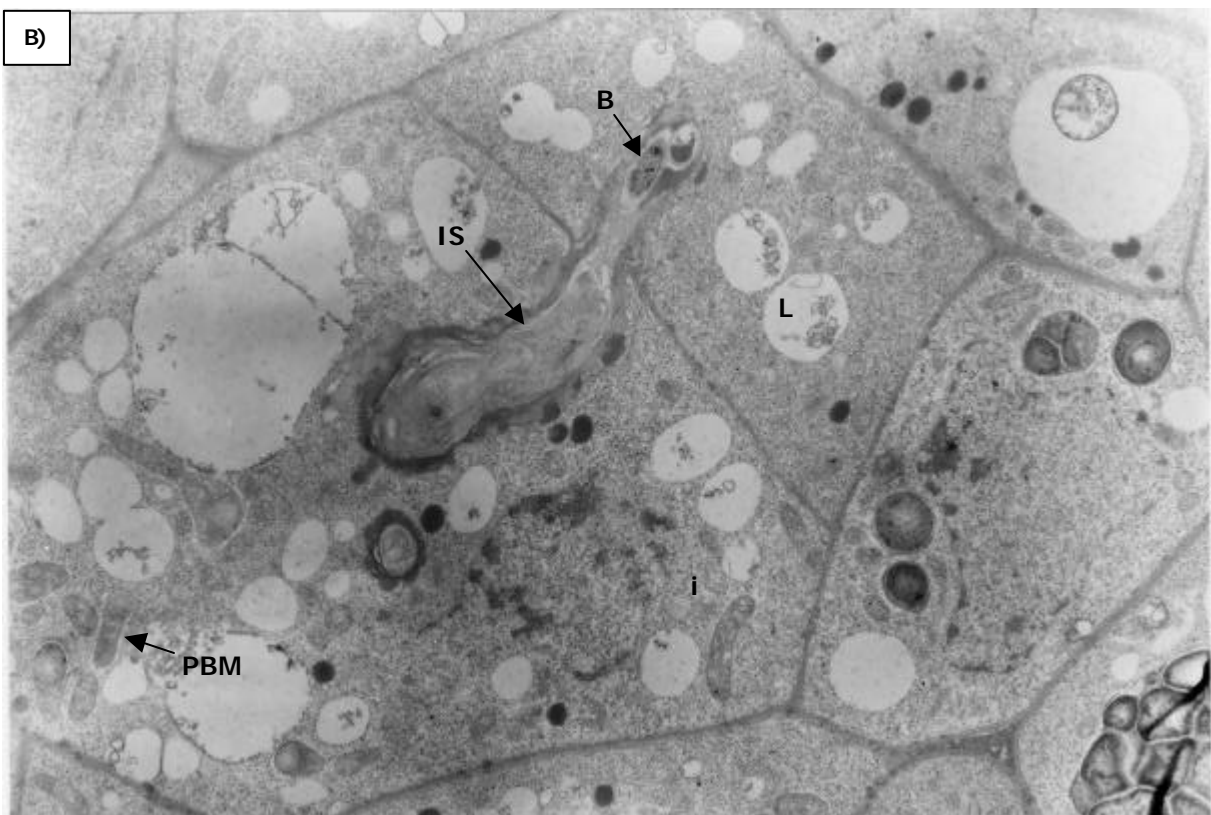
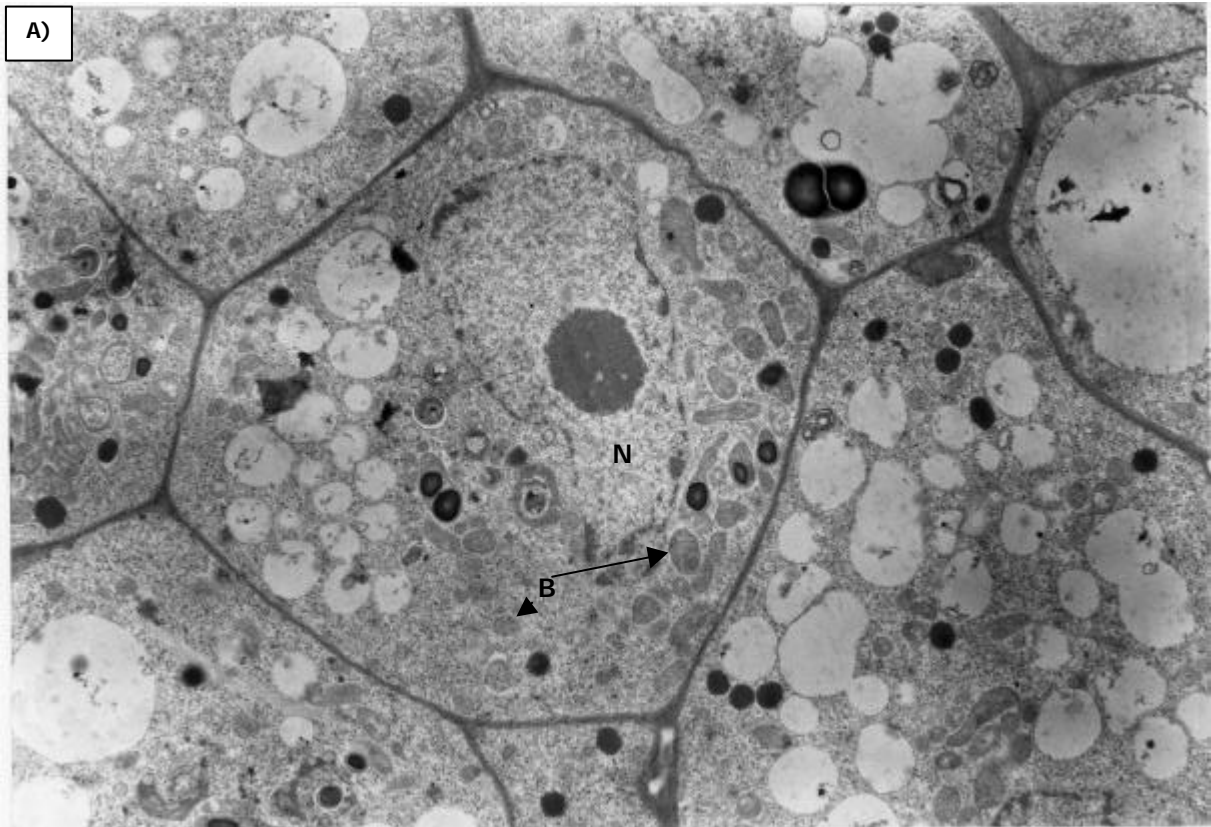


Abb.07: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten des inneren Gewebes von Wurzelknöllchen aus der Symbiose von *B. japonicum* 110spc4 mit *Glycine max* bv. Maple Arrow 21dpi. In den Aufnahmen wurden selektiv jeweils infizierte (i) und nicht-infizierte (n) Zellen sowie besonders beispielhafte Strukturen markiert: Zellwand (ZW), Vakuole (V), Stärkekörner (S), Infektionsschläuche (IS), die das Symbiosom umschließende Peribakteroiden Membran (PBM), Bakterioide (B) und Ablagerungen von poly-3-Hydroxy-Buttersäure (HB). Vergrößerung: 5410x (A); 18930x (B)



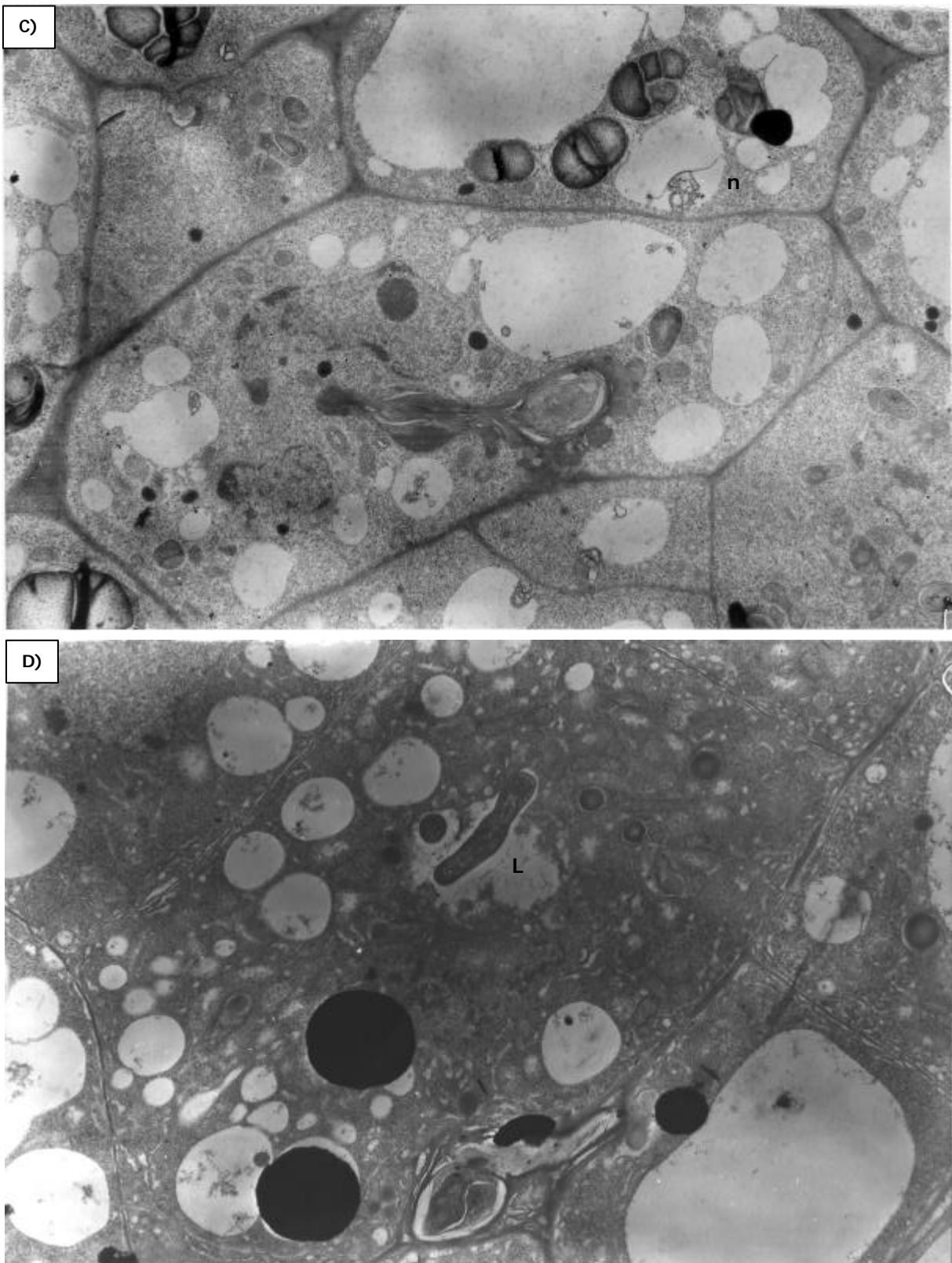


Abb.08: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten des inneren Gewebes von Wurzelknöllchen aus der Symbiose von *B. japonicum* 2-10 mit *Glycine max* bv. Maple Arrow (A, C, D) bzw. *Glycine max* bv. Preston (B) 21dpi. In den Aufnahmen wurden selektiv infizierte (i) und nicht-infizierte (n) Zellen sowie beispielhafte Strukturen markiert: Zellkern (N), potentielle Lysosomen (L), Infektionsschläuche (IS), die Peribakteroiden Membran (PBM) und Bakterioide (B).

Vergrößerung: 13140x (A); 14490x (B); 13720x (C); 11400x (D)

Die Zellen, infiziert mit *B. japonicum* 110spc4, zeichneten sich durch eine starke Besiedlung aus. Das Cytoplasma war mit Symbiosomen angefüllt, in den Symbiosomen wurde das Bakteroid eng von der Peribakteroidenmembran (PBM) umschlossen. Die Bakterioide waren gleichmäßig geformt und enthielten Granula von poly-3-Hydroxy-Buttersäure. In den infizierten Pflanzenzellen hingegen war kein ausgedehntes Vakuom zu sehen und auch Stärkekörner traten nur selten auf. Nur in Zellen, die nicht infiziert waren und in direkter Nachbarschaft zu den infizierten lagen, waren eine bzw. mehrere große Vakuolen und auch vermehrt Stärkekörner vorhanden (Abb.07). Das Erscheinungsbild entsprach den Untersuchungsergebnissen der letzten Jahrzehnte auf diesem Gebiet (Werner, 1992; Spaink *et al.*, 1998).

Im Gegensatz dazu waren die Zellen des inneren Knöllchengewebes, inokuliert mit *B. japonicum* 2-10, nur selten überhaupt erkennbar infiziert. Aus den Beobachtungen wurde deutlich, daß die Zellen der pflanzlichen Wurzelknöllchen entweder keine oder nur wenige Symbiosomen enthielten (Abb.08). In einigen Fällen war die PBM des Symbiosoms weit vom Bakteroid abgelöst (Abb.08D) und es waren auch Bakterioide zu erkennen, die auffallend ungleichmäßig geformt waren (Abb.08B).

Infektionsschläuche mit darin befindliche Bakterien, die keine phänotypischen Besonderheiten aufwiesen, konnten identifiziert werden (Abb. 08B). Auch solche durch einen Infektionsschlauch direkt infizierten Pflanzenzellen enthielten nur eine sehr geringe Anzahl von Bakteroiden. Darüberhinaus konnten aber auch mehrfach Infektionsschläuche ausgemacht werden, in denen keine (Abb.08C) oder bereits augenscheinlich deformierte (Abb.08D) Bakterien zu erkennen waren.

Sowohl die nicht infizierten Zellen (diese Aussage bezieht sich nur auf die zweidimensionale Aufnahme im Elektronenmikroskop, sie kann das Vorhandensein von Symbiosomen in der dreidimensionalen Pflanzenzelle nicht ausschließen) als auch die Zellen mit Symbiosomen wiesen ein stark ausgebildetes Vakuom auf, meist bestehend aus einer Vielzahl kleiner Vakuolen. Ein Teil der Vakuolen war mit elektronendichten Bestandteilen gefüllt, was darauf schließen läßt, daß es sich hierbei um Lysosomen gehandelt haben kann, in denen die Bakterioide von den Pflanzenzellen abgebaut wurden. Es befand sich außerdem eine relativ große Zahl von Stärkekörnern in den Pflanzenzellen, entsprechend den nicht infizierten Zellen in den Knöllchen der Symbiose von *Glycine max* mit *B. japonicum* 110spc4.

Es bleibt zu erwähnen, daß in den ersten Untersuchungen eine weitere Sorte der Sojabohne eingesetzt wurde, *Glycine max* bv. Preston. Da sich aber keine Unterschiede

im symbiotischen Phänotyp zeigte, weder in der Interaktion mit dem WT *B. japonicum* 110*spc4* noch mit der Mutante *B. japonicum* 2-10, wurde in den folgenden Untersuchungen nur noch *Glycine max* bv. Maple Arrow verwendet.

3.3. Der Phänotyp von *B. japonicum* 2-10 unter freilebenden Bedingungen

Nicht nur die Auswirkungen der Mutagenese auf den Phänotyp von *B. japonicum* 2-10 in der Symbiose mit *Glycine max* sind wichtig, auch die Bedeutung des mutierten DNA-Bereiches für das Überleben und den Zellzyklus des Bakteriums unter freilebenden Bedingungen sind für die Auswertung und die möglichst klare Einordnung der Vorgänge in den Kontext der anderen Untersuchungsergebnisse zu diesem System bzw. der Symbiose im Allgemeinen entscheidend.

3.3.1. Das Wachstum von *B. japonicum* 2-10 auf Agarplatten

Bei der Anzucht der *B. japonicum* Stämme auf Agarplatten zeigten sich Unterschiede in der äußeren Erscheinung der Kulturen.

Bei Wachstum auf X-P haltigem Vollmedium konnten Unterschiede in der Färbung zwischen *B. japonicum* 2-10 und *B. japonicum* 110*spc4* beobachtet werden (Abb.09). Sowohl nach aerober als auch nach mikroaerober Anzucht bei für 7 d bei 28 °C waren die Bakterienkolonien von *B. japonicum* 2-10 stärker blau gefärbt, als diejenigen von *B. japonicum* 110*spc4*, was auf eine Expression des Reportergens *phoA* in der Mutante hindeutete.

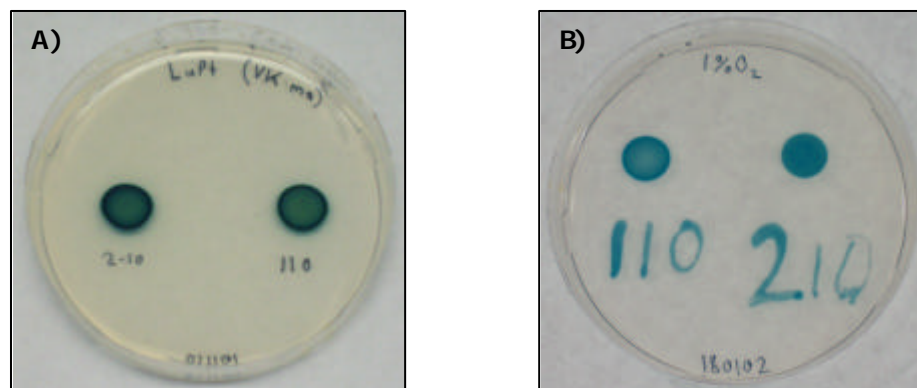


Abb.09: Photographische Dokumentation des Wachstums von *B. japonicum* 110*spc4* (110) und *B. japonicum* 2-10 (2-10) auf X-P haltigen Vollmedium-Agarplatten. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C für 7 d unter aeroben (A) bzw. mikroaeroben (B) Bedingungen.

In Vollmedium (20E) gewachsene Vorkulturen wurden auf Kongorot-haltigen Agarplatten des gleichen Mediums aufgetropft und für 7 d bei 28 °C inkubiert (Abb.10).

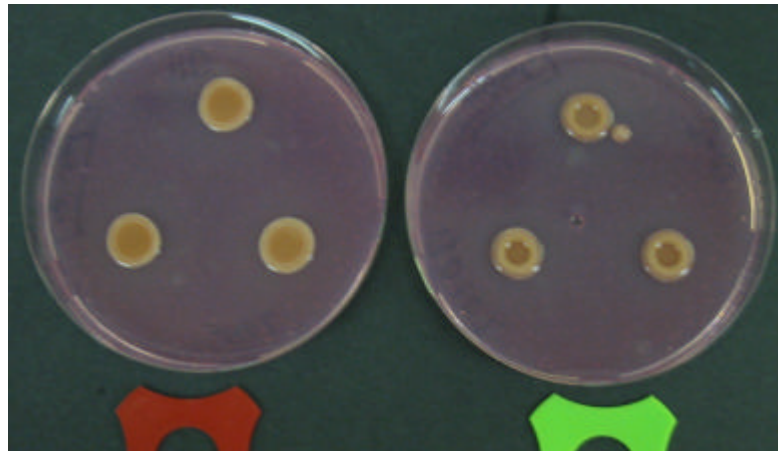


Abb.10: Photographische Dokumentation des Wachstums von *B. japonicum* 110spc4 (rote Markierung, links) und *B. japonicum* 2-10 (grüne Markierung, rechts) auf Vollmedium-Agarplatten mit Kongorot. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C für 7 d.

Die resultierenden Kolonien von *B. japonicum* 2-10 zeigten einen deutlich stärker ausgeprägten und höheren Rand, sie erschienen so wesentlich mukosier als die Kolonien des WT *B. japonicum* 110spc4.

3.3.2. Das Wachstum von *B. japonicum* 2-10 in Flüssigkultur

Bei der Anzucht von *B. japonicum* in Vollmedium (20E) wurde von einer Flüssigkultur in der logarithmischen Phase, die vor ihrer Verwendung 24 h bei 4 °C inkubiert wurde, als Vorkultur ausgegangen und die Hauptkultur auf eine LZZ von ca. $3 \cdot 10^6$ cfu·ml⁻¹ und eine OD₆₀₀ von ca. 0,003 angeimpft.

Unter diesen Voraussetzungen wuchsen *B. japonicum* 110spc4 und *B. japonicum* 2-10 in der aeroben Anzucht praktisch gleich, wenn die LZZ betrachtet wurde (Abb.11). Die lag-Phase war gleich lang und auch die log-Phase (und somit die Verdopplungszeit) sowie das Erreichen und die Höhe der stationären Phase zeigten keine deutlichen Veränderung bei der Mutante im Vergleich zum WT. Allerdings begann die Absterbephase von *B. japonicum* 2-10 bereits nach 168 h, während der WT *B. japonicum* 110spc4 zu diesem Zeitpunkt noch in der stationären Phase verweilte.

Ein zusätzlicher Unterschied zwischen WT und Mutante wurde bei der Messung der OD₆₀₀ deutlich (Abb.12). Auch hier stimmten die Werte für die ersten 72 h der Anzucht der

beiden Bakterienstämme überein, ab einer OD_{600} von etwa 2,0 verlangsamte sich die Steigerung bei *B. japonicum* 2-10 drastisch und das von beiden Stämmen nach ca. 130 h erreichte Maximum lag beim WT *B. japonicum* 110spc4 bei ca. 7,2 und bei der Mutante *B. japonicum* 2-10 dagegen bei nur ca. 4,0.

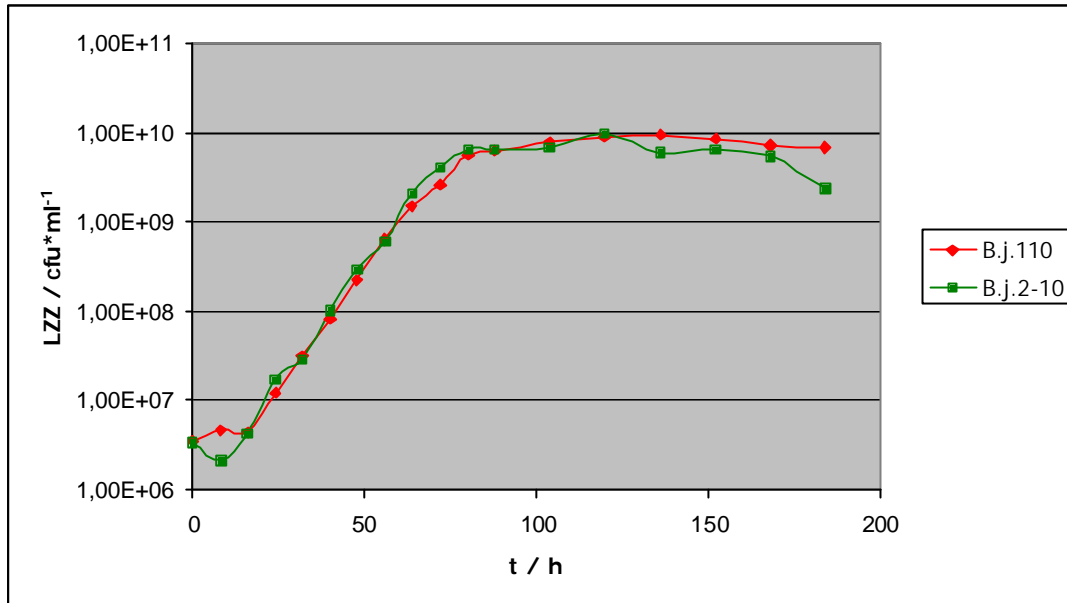


Abb.11: Graphische Darstellung des Wachstums von *B. japonicum* 110spc4 (B.j.110) und *B. japonicum* 2-10 (B.j.2-10) unter aeroben Bedingungen in 20E-Medium bei 28 °C, ausgehend von unter gleichen Bedingungen angezogenen Vorkulturen in Flüssigmedium, die vor der Inokulation der Hauptkultur 24 h bei 4 °C gelagert wurden. Dargestellt ist die LZZ in $\text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ gegen die Zeit in h.

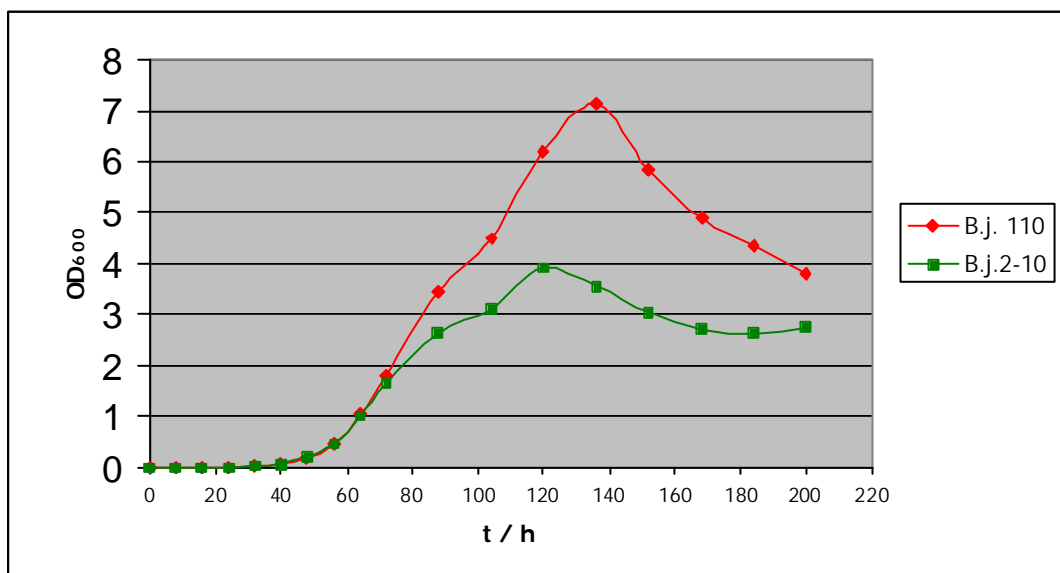


Abb.12: Graphische Darstellung des Wachstums von *B. japonicum* 110spc4 (B.j.110) und *B. japonicum* 2-10 (B.j.2-10) unter aeroben Bedingungen in 20E-Medium bei 28 °C, ausgehend von unter gleichen Bedingungen angezogenen Vorkulturen in Flüssigmedium, die vor der Inokulation der Hauptkultur 24 h bei 4 °C gelagert wurden. Dargestellt ist die OD_{600} gegen die Zeit in h.

Ein klarer Effekt der Mutation in *B. japonicum* 2-10 zeigte sich dagegen in der LZZ bei der Anzucht in Vollmedium (20E), wenn die Hauptkultur in 20E Medium von einer PSY-Medium Agarplatte (inkubiert für ca. 30 d bei 4 °C) beimpft wurde (Abb.13). Auch unter diesen Umständen entsprachen log Phase und stationäre Phase im Wachstum der Mutante zwar den Werten des WT, die lag-Phase war bei *B. japonicum* 2-10 allerdings um etwa 64 h verlängert. Die Anpassung an stark veränderte Wachstumsbedingungen war bei der Mutante *B. japonicum* 2-10 somit deutlich verlangsamt.

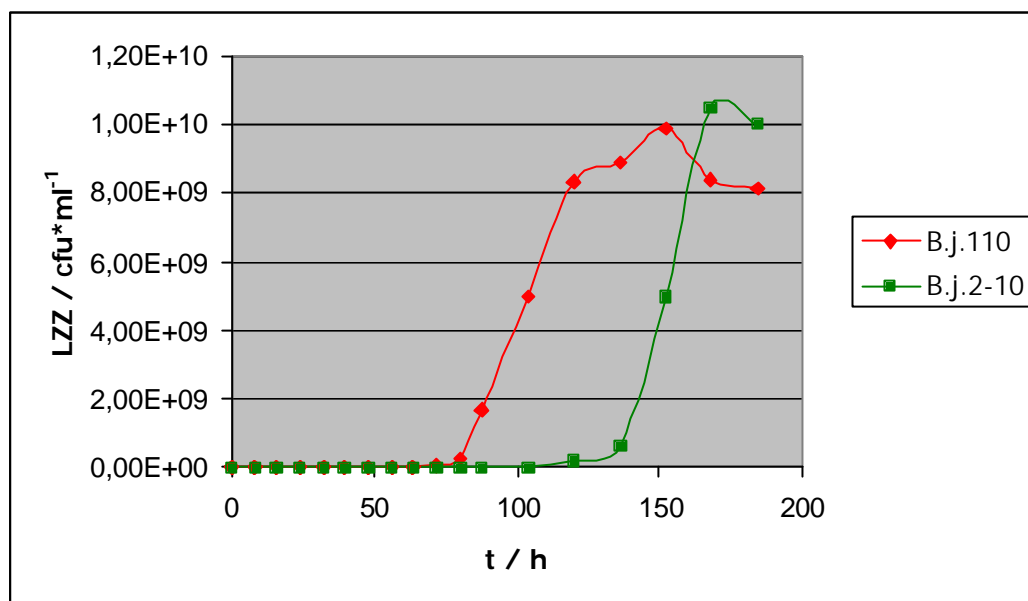


Abb.13: Graphische Darstellung des Wachstums von *B. japonicum* 110spc4 (B.j.110) und *B. japonicum* 2-10 (B.j.2-10) unter aeroben Bedingungen in 20E-Medium bei 28 °C, ausgehend von für 7 d bei 28 °C auf Agarplatten angezogenen Vorkulturen, die vor der Inokulation der Hauptkultur ca. 30 d bei 4 °C gelagert wurden. Dargestellt ist die LZZ in cfu·ml⁻¹ gegen die Zeit in h.

Bei Wachstum von *B. japonicum* unter aeroben Bedingungen in Vollmedium (20E) kam es zu einer leichten Erhöhung des pH Wertes im umgebenden Medium. Mit steigender optischer Dichte und Lebendzellzahl der Kultur, stieg der pH-Wert im Medium von anfangs 6,8 stetig auf Werte bis zu 7,5-8,0 an (bei Kulturen maximaler OD, mit einer LZZ von $5 \cdot 10^9$ - $1 \cdot 10^{10}$ cfu/ml). Die regelmäßig durchgeführten Messungen im Überstand, nach Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation, verdeutlichten, daß in dieser Hinsicht keine meßbaren Unterschiede zwischen *B. japonicum* 2-10 und dem WT auftraten.

3.3.3. Die Größe der Zellen von *B. japonicum* 2-10 in Flüssigkultur

Zum Vergleich der beiden Stämme bezüglich ihrer äußeren Erscheinung wurden die Bakterien in Vollmedium (20E) unter aeroben Bedingungen angezogen.

In verschiedenen Stadien des Wachstums wurden Aliquots der Kulturen entnommen. Die optische Dichte (OD_{600}) wurde bestimmt und die Kulturen wurden bei 10.000 g für 6 min bei RT zentrifugiert.

Die Zentrifugation resultierte in einem Bakterienpellet und einer darüber treibenden Schleimwolke aus nicht-pelletierendem Wasser-unlöslichem Material (diese Schleimwolke konnte nicht durch Waschen entfernt bzw. in A. bidest. gelöst werden). In der Schleimwolke waren auch die Bakterien des jeweiligen Stammes enthalten, die LZZ entsprach in der Dimension der LZZ der gesamten Kultur.

Bei gleicher OD_{600} war in allen Fällen die Schleimwolke der Kulturen von *B. japonicum* 2-10 deutlich voluminöser als die des WT (Abb.14). Bei jungen Kulturen war bei *B. japonicum* 110*spc4* Schleimwolke nicht erkennbar bzw. so klein, daß von ihr kein Aliquot entnommen werden konnte (Abb.14A). Erst bei einer $OD_{600} = 4,5$ wurde auch beim WT eine untersuchbare Schleimwolke beobachtet (Abb.14B).

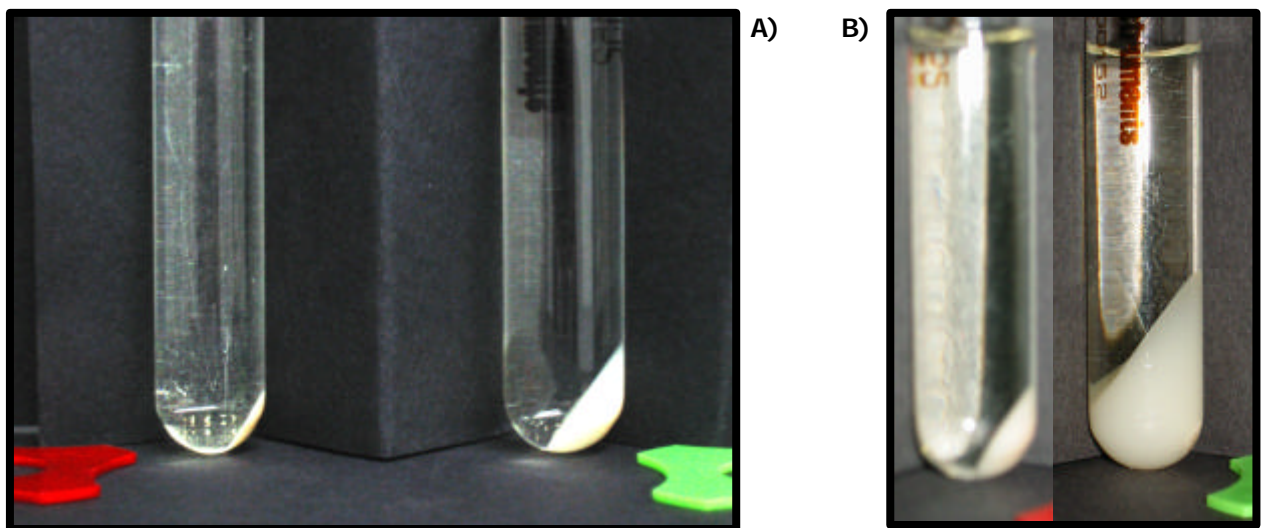


Abb.14: Photographische Dokumentation der Bakterienkulturen von *B. japonicum* 110*spc4* (rote Markierung, links) und *B. japonicum* 2-10 (grüne Markierung, rechts) bei Anzucht in Vollmedium (20E) unter aeroben Bedingungen, nach Zentrifugation (10.000 g; 6 min).

A) $OD_{600} = 1,6$

B) $OD_{600} = 4,5$

Aus den verschiedenen Fraktionen wurden Proben mittels einer Fuchsin Lsg. angefärbt und bei 1000facher Vergrößerung lichtmikroskopisch untersucht.

Zwischen dem WT *B. japonicum* 110*spc4* und der Mutante *B. japonicum* 2-10 waren keine Unterschiede in der Form sichtbar, die Zellen beider Stämme waren gleichmäßig geformte Stäbchen.

Das Ausmessen von jeweils mindestens 20 Bakterienzellen von verschiedenen Stellen mehrerer Präparate aus Kulturen unterschiedlicher Wachstumsstadien zeigte, daß die Bakterien mit dem Alter der Kultur an Größe verloren.

Der Vergleich von WT und Mutante erwies allerdings, daß die Zellen von *B. japonicum* 2-10 bei gleicher optischer Dichte durchschnittlich ca. 20 % kleiner waren als die von *B. japonicum* 110*spc4* (Abb.15). Gleichzeitig wurde beobachtet, daß die in der Schleimwolke verbliebenen Bakterien im Durchschnitt größer waren als die pelletierten.

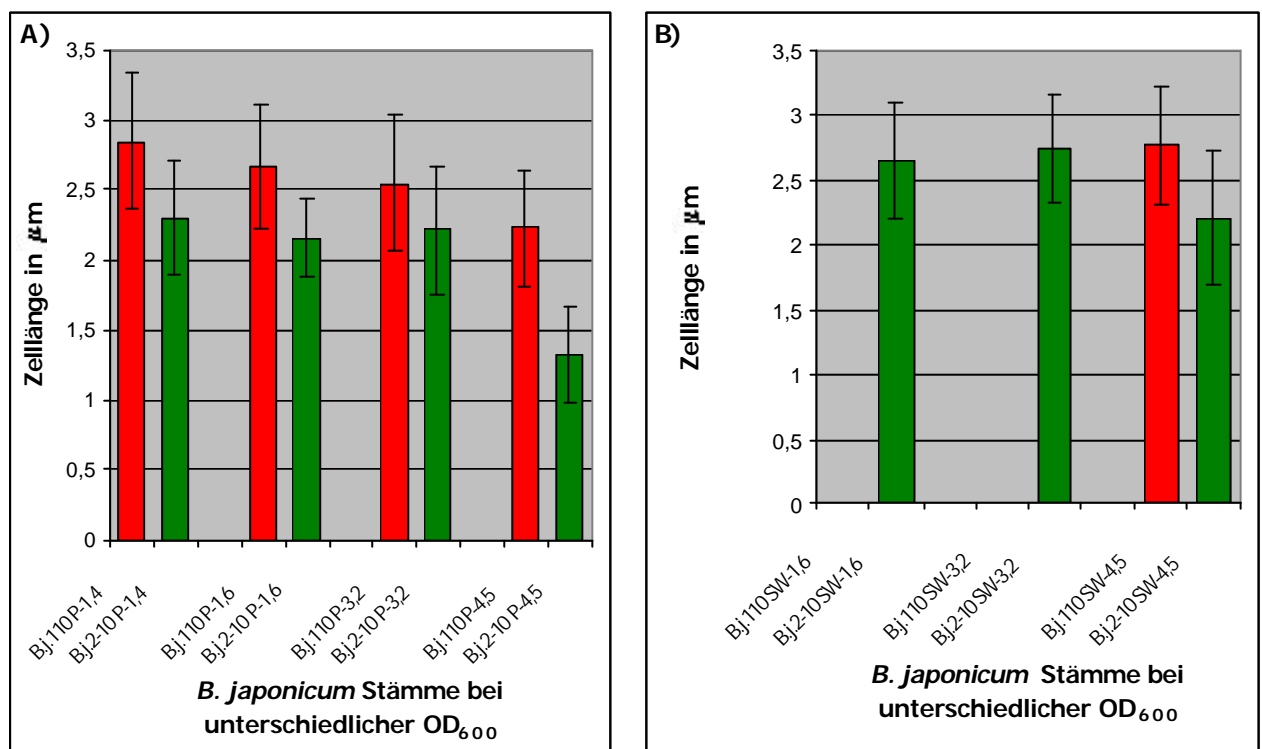


Abb.15: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Größe der Bakterienzellen von *B. japonicum* 110*spc4* (B.j.110) und *B. japonicum* 2-10 (B.j.2-10) bei Anzucht in Vollmedium (20E) unter aeroben Bedingungen in verschiedenen Stadien des Wachstums. Angegeben ist die jeweilige Optische Dichte OD_{600} der Kultur. Angegeben ist jeweils der Mittelwert der Größe eines einzelnen Bakteriums als Balken, sowie die Standardabweichung als senkrechte Linie.

In (A) sind die Bakterien aus dem Pellet und in (B) die aus der Schleimwolke dargestellt, den unterschiedlichen Fraktionen, in denen die Bakterien nach der Zentrifugation vorlagen.

3.3.4. HPLC-Analyse der Exopolysaccharide

Die löslichen Exopolysaccharide (EPS) von *B. japonicum* 110spc4 und *B. japonicum* 2-10 wurden aus 4 d alten Flüssigkulturen, angezogen in je 200 ml 20E-Medium, gewonnen und gereinigt.

Unterschiede in der Ausbeute waren nicht signifikant und wurden auf eventuelle Wachstumsunterschiede der Bakterienkulturen zurückgeführt.

Die HPLC-Analyse der isolierten und gereinigten EPS zeigte keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Fraktionen und ihrem Verhältnis zueinander (Abb.16). Allerdings war diese Auftrennung der EPS nicht so exakt und sauber, wie dies unter optimierten Bedingungen erreicht werden konnte und in Abb.16D dargestellt ist.

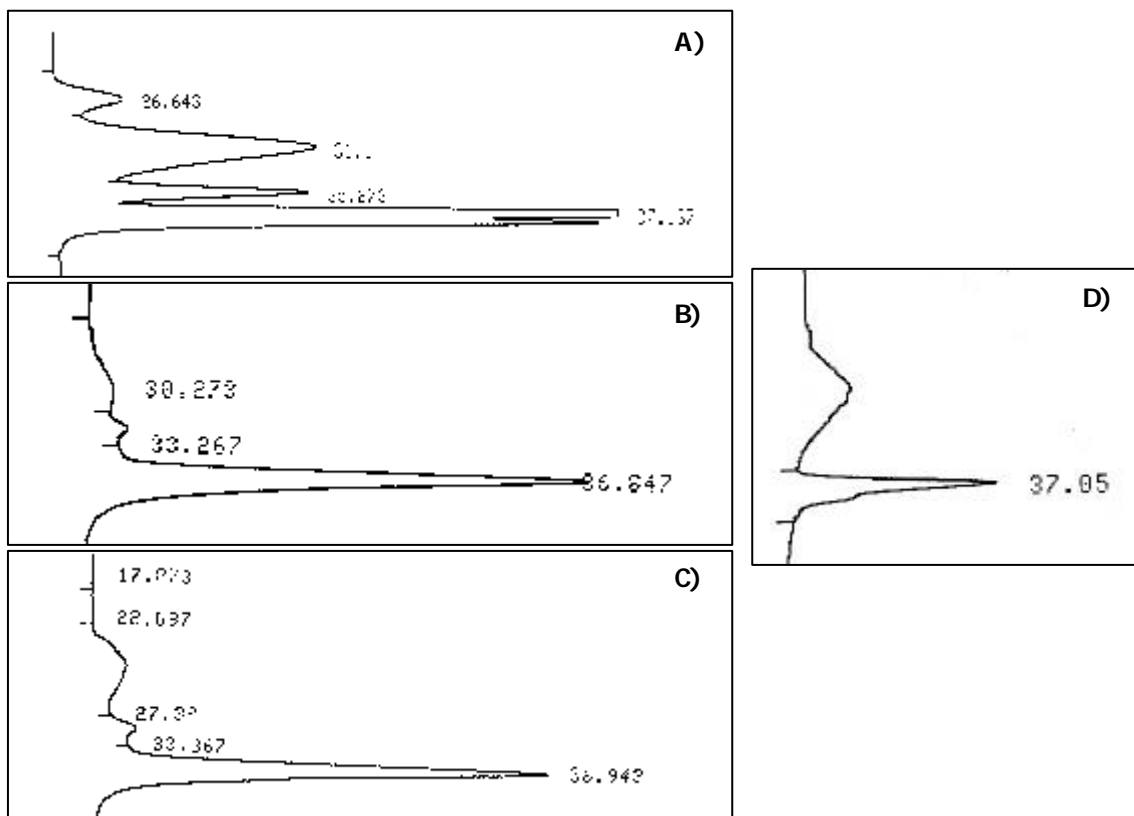


Abb.16: Profile der HPLC-Auftrennung der EPS von *B. japonicum* 110spc4 und *B. japonicum* 2-10.

- A) Pullulan Standard zur Eichung der Anlage: von oben nach unten gesehen liegen die Peaks bei $1,6 \cdot 10^6$ Da (26.643), $4,0 \cdot 10^5$ Da (31.1), $2,0 \cdot 10^5$ Da (35.273) und $1,0 \cdot 10^4$ Da (37.137)
- Bei den EPS-Isolaten der Bakterien in B), C) und D) gilt: ein Peak bei ca. 10^5 - 10^6 Da ($\sim 30,3$) ist die Darstellung des HMW-EPS, ein Peak bei ca. 10^3 Da ($\sim 36,9$) ist die Darstellung des LMW-EPS
- B) *B. japonicum* 110spc4: Die EPS des WT liegen in der HMW- und der LMW-Form vor.
- C) *B. japonicum* 2-10: Die EPS der Mutante liegen in der HMW- und der LMW-Form vor.
- D) *B. japonicum* 110spc4 (aus Becker *et al.*, 1998): Analyse der EPS aus optimierter Anzucht, die EPS des WT liegen in der HMW- und der LMW-Form vor.

Sowohl beim WT *B. japonicum* 110*spc4* als auch bei der Mutante *B. japonicum* 2-10 konnte in den EPS eine HMW-Fraktion von ca. 10^2 - 10^3 kDa und eine LMW-Fraktion von ca. 1 kDa identifiziert werden. Diese Ergebnisse deckten sich mit bereits durchgeführten Untersuchungen (Becker *et al.*, 1998; Louch *et al.*, 2001). Die isolierten EPS wiesen aber eine Auftrennung in drei Peaks auf, nicht nur in zwei, wie dies unter optimierten Bedingungen der Fall war (Abb.16D). Ein Zwischenpeak mit einer Retentionszeit von ca. 33,3 wurde zusätzlich zu den erwarteten Peaks detektiert. Der Vergleich der in Abb.16 dargestellten HPLC-Graphen deutete darauf hin, daß die LMW-Fraktion unverändert produziert wurde, die Rhizobien das HMW-EPS allerdings bei der Anzucht in 20E-Medium nicht einheitlich synthetisierten. Bei einigen Isolaten zeigte die Auftrennung des HMW-EPS außerdem eine stark verbreiterte Massenverteilung, was diese mögliche Erklärung unterstützt.

Es konnte sich bei dem Zwischenpeak andererseits auch um eine Verunreinigung durch LPS oder CPS gehandelt haben, da die Massenauftrennung der HPLC und der verwendete Detektor keine Aussagen über die stoffliche Zusammensetzung der Peaks lieferte.

Das Verhältnis von LMW-EPS zu HMW-EPS wurde aus dem Flächeninhalt der HPLC-Peaks berechnet, er betrug beim WT *B. japonicum* 110*spc4* 3:1, wenn man die beiden ersten Peaks als HMW-Fraktion addiert, bei *B. japonicum* 2-10 war der Wert mit 2,6:1 leicht zugunsten des HMW-EPS verschoben. Bei vorherigen Analysen wurde im EPS des WT ein Verhältnis von 1:1 zwischen HMW- und LMW-EPS gemessen (Abb.16D), der Anteil der HMW-Fraktion im EPS war also deutlich höher.

Den ersten Peak alleine als HMW-Fraktion der EPS zu definieren war erschwert, da nur bei etwa der Hälfte der Analysen eine differenzierte Berechnung dieses Peaks geliefert wurde. Wenn man den Anteil des Zwischenpeaks für die anderen Analysen extrapolierte, konnte auf den Anteil des HMW-EPS zurück geschlossen werden. Im Durchschnitt war auch bei dieser Berechnung das Verhältnis von LMW-Fraktion (Peak3) zu HMW-Fraktion (Peak1) bei der Mutante *B. japonicum* 2-10 mit 3,9:1 leicht zugunsten des HMW-EPS verschoben, beim WT betrug das so berechnete Verhältnis LMW-EPS:HMW-EPS durchschnittlich 4,7:1.

Unabhängig von dem zusätzlich aufgetretenen Zwischenpeak zeigte diese Analyse deutlich, daß *B. japonicum* 110*spc4* und *B. japonicum* 2-10 keine qualitativen Unterschiede aber geringe quantitative Unterschiede in den ins Medium exkretierten EPS aufwiesen.

3.3.5. Vergleich des Gesamtproteins mittels eindimensionaler SDS-PAGE

Um die Proteine der Bakterienstämme *B. japonicum* 110spc4 und *B. japonicum* 2-10 unterscheiden zu können, wurden beide in Vollmedium (20E) für 42 h unter aeroben bzw. mikroaeroben Bedingungen angezogen (ausgehend von einer Vorkultur in der späten logarithmischen Phase). Bei der Ernte hatten die Bakterienkulturen eine OD₆₀₀ von ca. 2,4 (aerob) bzw. 1,4 (mikroaerob) und eine LZZ von durchschnittlich $3 \cdot 10^8$ cfu·ml⁻¹. Die Zellen wurden aufgeschlossen und das Gesamtprotein mittels SDS-PAGE nach der Größe aufgetrennt (Abb.17).

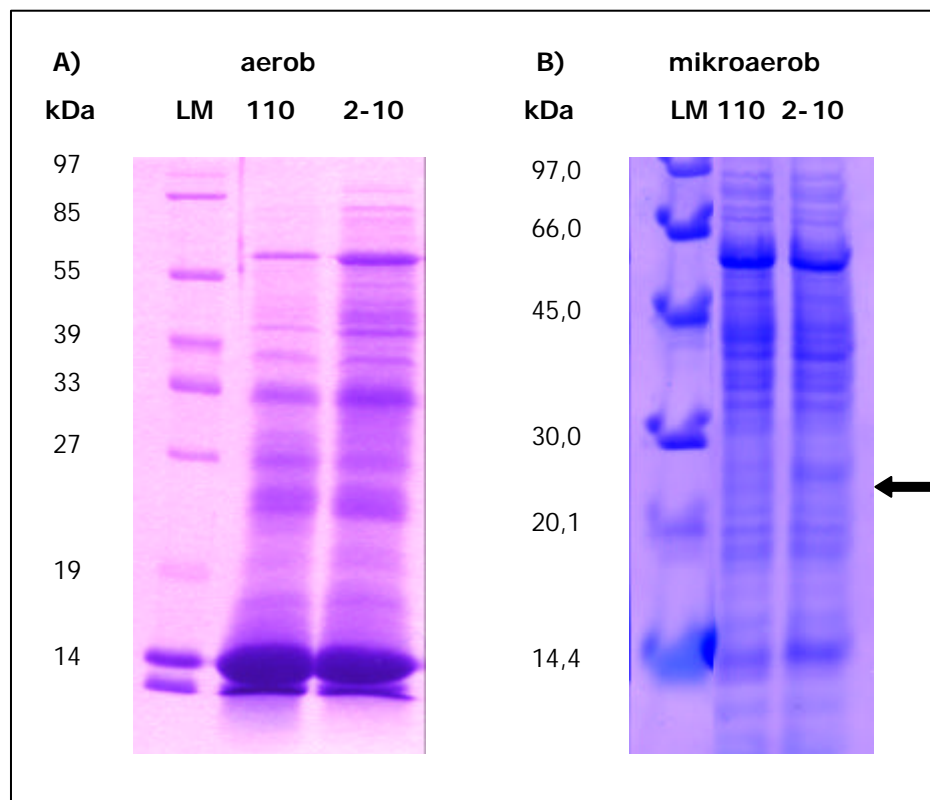


Abb.17: SDS-PAGE des Gesamtproteins von *B. japonicum* 110spc4 (110) und *B. japonicum* 2-10 (2-10), angefärbt mittels Coomassie. Die Anzucht erfolgte in 20E-Medium bei 28 °C.

A) Anzucht unter aeroben Bedingungen.

B) Anzucht unter mikroaeroben Bedingungen (1-2 % O₂ in der Atmosphäre). Durch einen Pfeil ist der Bereich markiert, in dem die Präparation von *B. japonicum* 110spc4 eine Bande enthält, die bei *B. japonicum* 2-10 fehlt.

Unter aeroben Anzuchtbedingungen zeigte sich kein Unterschied in dem Protein-Muster der eindimensionalen Auftrennung zwischen *B. japonicum* 110spc4 und *B. japonicum* 2-10 (Abb.17A).

Nach mikroaerober Anzucht, die bezüglich des Sauerstoffpartialdruckes den Bedingungen im Knöllcheninneren entsprach (Werner, 1992), konnte im SDS-PAG allerdings eine Bande bei ca. 27 kDa identifiziert werden, die in *B. japonicum* 110*spc4* eindeutig vorhanden war, in den Präparationen von *B. japonicum* 2-10 dagegen fehlte (Abb.17B, durch Pfeil markiert).

3.3.6. Das Wachstum und die N₂-Fixierung bei Anzucht in High K⁺ Medium

Um herauszufinden, ob die Mutante *B. japonicum* 2-10 in der Lage ist, molekularen Stickstoff zu fixieren oder ob die Mutation auch eine Beeinträchtigung der Nitrogenase-Aktivität zur Folge hatte, wurden WT und Mutante auf diese Fragestellung hin untersucht. Bradyrhizobien können auch freilebend Luftstickstoff fixieren, für die Dereprimierung der Nitrogenase *ex planta* ist allerdings ein niedriger O₂-Partialdruck und eine geringe Menge gebundenen Stickstoffs in Form von Glutamat nötig (Wilcockson *et al.*, 1978).

Die Stämme wurden parallel in High K⁺ Weichagar-Medium angezogen, um die benötigten Bedingungen für eine Dereprimierung der Nitrogenase herzustellen.

Nach 14 d Inkubation bei 28 °C konnte in den Kulturen beider Stämme ein deutlicher Wachstumsring etwa 4 mm unter der Oberfläche des Mediums beobachtet werden, der in den folgenden 7 d Inkubation noch klarer ausgebildet wurde (Abb.18). In anderen Bereichen des Mediums konnte unter diesen Anzuchtbedingungen kein Wachstum der untersuchten Stämme beobachtet werden. Dieses Wachstumsverhalten wurde mehrfach reproduziert und entsprach den Beobachtungen von Schultes (Schultes, 1990).

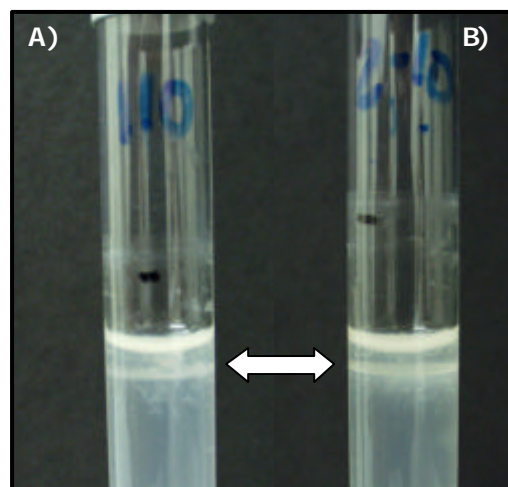


Abb.18: Fotografische Darstellung der Kulturen von *B. japonicum* 110*spc4* (A) und *B. japonicum* 2-10 (B) in High K⁺ Medium Standkulturen, inkubiert bei 28 °C für 21 d.

Durch einen Pfeil ist die Zone markiert, in der die Bakterien deutliches Wachstum zeigten, sie lag bei beiden Stämmen ca. 4 mm unter der Oberfläche des Mediums.

Den vollständigen Beweis über die Effizienz der Nitrogenase in *B. japonicum* 2-10 lieferte der anschließende Acetylenreduktionstest der Weichagarkulturen.

Diese Methode ist sehr anfällig und nicht als Screeningverfahren geeignet, da die Ergebnisse zwar eindeutig aber nicht einfach reproduzierbar sind (Schultes, 1990). Die meßbare Nitrogenase-Aktivität war sehr gering und schien unter anderem vom Wachstum der Bakterienkultur abhängig zu sein aber höchstwahrscheinlich auch von einer Reihe weiterer Faktoren.

Dieser Test war ausschließlich als qualitativer Nachweis zu werten, mehr konnte und sollte diese Untersuchung nicht liefern. Denn darüberhinaus konnte kein fehlerfreier Referenzwert (wie z.B. LZZ) von der Weichagar-Bakterienkultur definiert werden und auch die Beziehung auf das Volumen der Gasphase (ca. 10 ml in einem Reaktionsgefäß mit ca. 20 ml Volumen) konnte aufgrund der Diffusion im Agar nicht sinnvoll in eine Berechnung einfließen. Außerdem war bei längeren Inkubationen, wie sie hier nötig waren, ein Verlust durch Undichtigkeit der Apparatur unvermeidlich.

Es wurden mehrere identische Versuchsansätze durchgeführt, von denen nur etwa jeder fünfte ein positives Ergebnis lieferte. In einer 14 d alten Kultur von *B. japonicum* 110spc4 sowie einer 21 d alten Kultur von *B. japonicum* 2-10 konnte nach einer Inkubation mit Ethin von mindestens 1,5 h (bis zu 25 h) eine Nitrogenase-Aktivität beobachtet werden, die gemessene Umsetzung war allerdings in allen Fällen sehr gering und lag bei 0,2-2,7 nmol Ethin pro Stunde, bezogen auf die gesamte Bakterienkultur und eine Gasphase von 10 ml.

3.4. Isolierung und Sequenz Analyse der mutierten DNA-Region im Genom von *B. japonicum* 110spc4

Für die Analyse der Mutante *B. japonicum* 2-10 sowie die Zuordnung des Phänotyps und seine Eingliederung in die Vorgänge der Symbiose, war eine Analyse des Genotyps, verändert durch die Transposon-Insertion, von zentraler Bedeutung.

Um den Ort der Insertion des Transposons *TnphoA* exakt definieren zu können, mußte der umgebende DNA-Bereich aus dem Genom von *B. japonicum* 2-10 kloniert und sequenziert werden.

3.4.1. Klonierung der die *Tn_{phoA}* Insertion umgebenden DNA-Fragmente

Anhand der Ergebnisse des Southern Blotting (Abb.04) wurde das ca. 8,5 kb große *Bam*HI Fragment, das die upstream der Insertion gelegene DNA-Region enthält, sowie das ca. 10,0 kb große *Eco*RI Fragment, das die downstream gelegene DNA-Region enthält, für die Klonierung ausgewählt.

Die isolierte und gereinigte genomische DNA von *B. japonicum* 2-10 wurde mit *Bam*HI bzw. *Eco*RI restringiert und in einem Agarosegel nach der Fragmentgröße aufgetrennt. Der gesuchte Größenbereich der jeweiligen Restriktion wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA wurde isoliert.

Anschließend wurden die DNA-Fragmente in den mit derselben Restriktions Endonuklease geöffneten Vektor pACYC184 ligiert. Die resultierenden Hybridplasmide wurden selektiert und isoliert. Mit Hilfe einer Restriktionsanalyse konnten die Hybridplasmide pB8.5 und pE10.0 als diejenigen identifiziert werden, die nur das jeweilige gesuchte DNA-Fragment trugen, bestehend aus einem Anteil Transposon-DNA und einem Anteil *Bradyrhizobium japonicum* DNA.

Die Hybridplasmide pB8.5 und pE10.0 enthielten demzufolge Inserts, die zusammengenommen das DNA-Fragment repräsentieren, das in *B. japonicum* 2-10 die Transposon-Insertion trägt. Eine korrekte Transposition vorausgesetzt (Beweis lieferte die Sequenzierung, siehe 3.4.4.) ließ sich daraus das Ausgangsfragment ableiten, das die DNA-Sequenz aus dem Genom von *B. japonicum* 110*spc4* darstellte.

3.4.2. Physikalische Kartierung mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Das kontrollierte Zerschneiden der DNA von pB8.5 und pE10.0 mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen diente der Kartierung der DNA-Fragmente. Die isolierte und gereinigte DNA wurde sowohl durch einzelne als auch durch Kombinationen zweier unterschiedlicher Restriktionsendonukleasen geschnitten, die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente, in Abhängigkeit von ihrer Größe, ergab ein spezifisches Bandenmuster (Abb.19).

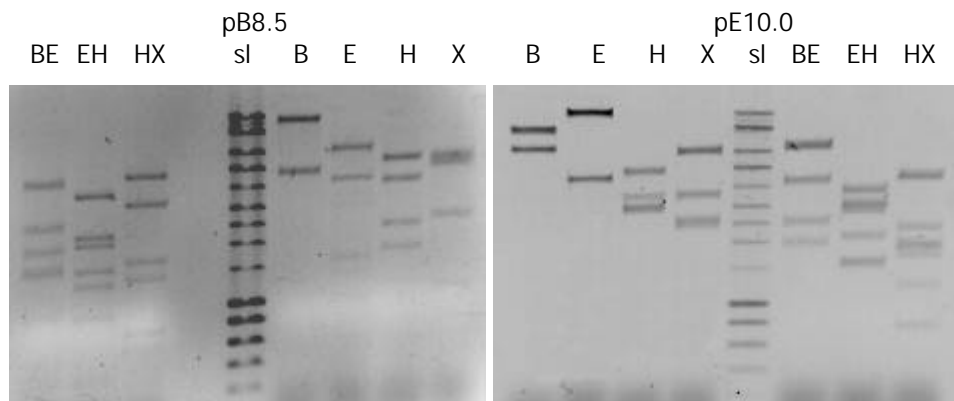


Abb.19: Invertierte Bilder von 0,8 %igen Agarosegelen. Sie zeigen das Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente, resultierend aus der Restriktion der Hybridplasmide pB8.5 und pE10.0 mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen bzw. deren Kombination.

Als Längenmarker diente die smart ladder (Life Technologies GmbH, Eggenstein).

Eingesetzte Restriktionsenzyme: *Bam*HI (B), *Eco*RI (E), *Hind*III (H), *Xho*I (X)

Die Kartierung des zu untersuchenden DNA-Bereiches erfolgte anhand der Fragmentgrößen, unter Berücksichtigung der bekannten Schnittstellen in dem Vektor pACYC184 und dem Transposon *TnphoA*. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte eine vorläufige Restriktionskarte erstellt werden (Abb.20), die allerdings noch keinen Anspruch auf Vollständigkeit hatte, da die gelelektrophoretischen Auftrennung nicht exakt genug ist, um DNA-Fragmente mit Längen von weniger als 200 bp eindeutig zu identifizieren.

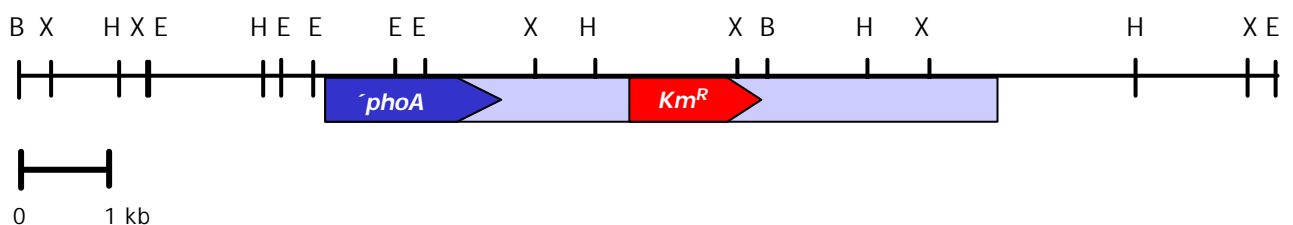


Abb.20: Schematische Darstellung der Restriktionskarte eines ca. 6,7 kb großen DNA-Fragmentes aus *B. japonicum* 2-10, das zusätzlich die Insertion des Transposons *TnphoA* (in blau dargestellt) enthält.

Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Bam*HI (B), *Eco*RI (E), *Hind*III (H) und *Xho*I (X) sind markiert.

3.4.3. Subklonierung und Synthese von DNA-Fragmenten mittels PCR

Anhand der Restriktionskarte wurden Fragmente ausgewählt, deren Enden sich möglichst überschneiden, um eine lückenlose Sequenzierung zu gewährleisten.

Die gesuchten DNA-Fragmente wurden durch Restriktion der Hybridplasmide pB8.5 und pE10.0, gelelektrophoretische Auftrennung und Aufreinigung der Banden aus dem Agarosegel isoliert und in Klonierungsvektoren (meist pBluescript® II KS+) umklontiert.

Da die Subklonierung alleine keine lückenlose Sequenzierung des gesamten DNA-Bereiches gewährleisten konnte, wurden zusätzlich die IRD800 markierten Primer 210BUB5, 210BUB6 und BUB7 konstruiert, um die Lücken durch direkte Sequenzierung von pB8.5 und pE10.0 zu schließen.

Darüberhinaus wurde der Ort der Transposon-Insertion aus dem Genom von *B. japonicum* 110spc4 mittels der speziell konstruierten Primer NcoIORF210N und BglIIORF210C amplifiziert, kloniert und sequenziert. Dadurch konnte diese, aufgrund von Stauchungen schwer lesbare DNA-Sequenz dieser Region verifiziert werden.

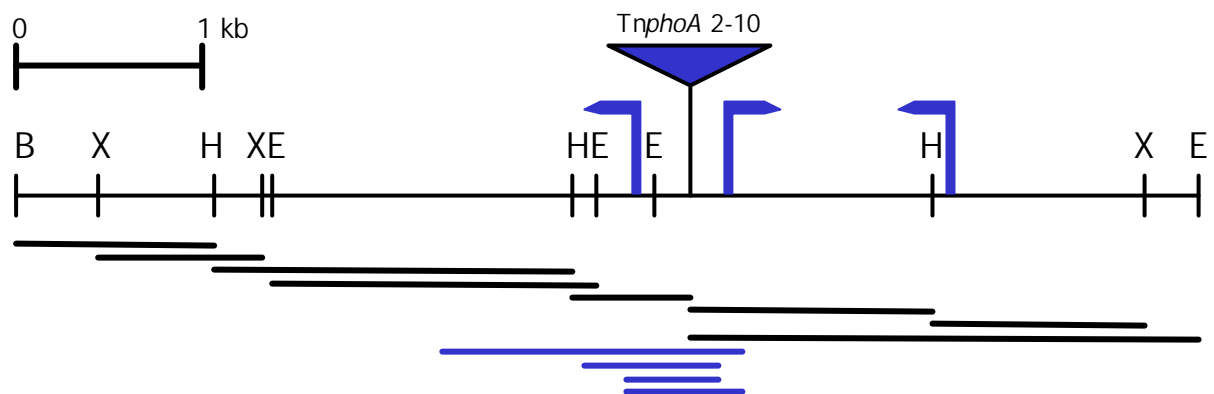


Abb.21: Schematische Darstellung von DNA-Fragmenten aus dem Genom von *B. japonicum* 2-10, die durch Subklonierung aus den Hybridplasmiden pB8.5 und pE10.0 gewonnen wurden (schwarz). Zusätzlich sind DNA-Fragmente dargestellt, die durch PCR aus *B. japonicum* 110spc4 amplifiziert wurde (blau). Bindestellen für speziell konstruierte Sequenzierprimer sind durch Pfeile kenntlich gemacht.

3.4.4. Die Nukleotid-Sequenz eines 6,7 kb großen DNA-Bereiches und die daraus abgeleitete AS-Sequenz der vorhandenen ORFs

Die für die Sequenzierung eingesetzten Subklone enthielten die in Abb.21 dargestellten Inserts, kloniert in Standardvektoren.

Die Sequenzierung mittels PCR, und die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung mit Hilfe des Li-Cor DNA Sequencers, lieferte eindeutige Sequenzdaten. Die auf diese Weise gewonnenen DNA-Sequenzen der verschiedenen Subklone wurden mit Hilfe der Computerprogramme Genmon 4.3 und GeneCompar 1.3 in ihrer Orientierung angeglichen und aneinandergefügt, wodurch die vollständige 6678 bp lange DNA-Sequenz des zu untersuchenden Fragmentes etabliert wurde (Abb.22).

Die aus diesen Analysen resultierende DNA-Sequenz war in den Datenbanken des NCBI noch unbekannt, sie wurde dort unter der Accession Number AF200320 gespeichert und damit für die Allgemeinheit zugänglich gemacht.

1 **GGATCC**GAGGGCAACAGGGACGCCACAAACCCGGCCGTCCTGCTTGATTCAATGAGGCGC 60
CCTAGGCTCCCGTTGTCCCTGCGGTGTTTGGGCCGGCAGGACGAACTAAGTTACTCCGCG

61 GCGGCTTCCCGGAATTGCCGGGCAAGCTCTTCCTGCTCTCCTCGCGCATAGTGCACGAGA 120
CGCCGAAGGGCCTTAACGGCCCGTTTCGAGAAGGACGAGAGGAGCGCGTATCACGTGCTCT

121 GCATGGTCACGGATGCAGTCGATTTGCTGCTTTAGGGCTTTGACGTGCATTACCGTGCCT 180
CGTACCAGTGCCTACGTACGTAAACGACGAAATCCCGAACTGCACGTAATGGCACGGA

181 CCCCCAAAGCCAATTTCGGCAACGGTGAGCGCCGTAGTGGCAGGGAGGGCAAAGATCTCAG 240
GGGGTTTTCGGTTAAGCCGTTGCCACTCGCGGCATCACCGTCCCTCCCGTTTCTAGAGTC

241 CGAGGTATTGCGCGCAAGAGTGTCGAGGGCATATTCCGGGTTGTTGAGCCGTCCGCCT 300
GCTCCATAACGCGCGCTTCTCACAGCTCCCGTATAAGGCCCAACAAGCTCGGCAGGCGGA

301 GAACAGTTACCGGATTGCCCCGTGCCGCCAGCGCGGGGTTTTCTTTTTTCGAGGCCATGA 360
CTTGTCATGGCCTAACGGGGCACGGCGGTGCGGCCCAAAAGGAAAAAGCTCCGGTACT

361 TCTTATGCGGCCTCCGTCTTGCGGGGGCAGTCTAGCATCTG**CTCGAG**CGCCTTGACCGGC 420
AGAATACGCCGAGGCAGAACGCCCCCGTCAGATCGTAGAC**GAGCT**CGCGGAAGTGGCCG

421 ACCTTCAGCAACCGCCCGATCTTGATCGTGGG**GATATC**TCCGCGCTCCGCCGCGGCGTAT 480
TGGAAGTCGTTGGCGGGCTAGAACTAGCACCC**CTATAG**AGGCGCGAGGCGGCGCCGCATA

481 GCGGCGTTCTTGAAAGCCCAAAGTAGCGCTGCCCGGCTTCGGGTACGCTGATCGTAAGC 540
CGCCGAAGGACCTTTCGGGTTTCATCGCGACGGGCCGAAGCCCATGCGACTAGCATTCTG

541 GCCTTCTCCGTCATTGCTCAGCTCCTTGCGGTACAAATCGTACCGTCAGAAGCTGGCTG 600
CGGAAGAGGCAGTAACGAGTCGAGGAACGCCATGTTTTAGCATGGCAGTCTTCGACCGAC

601 CTTGCTGCTACCCTGCAAGAACTTTTTTGTACCTATGCGGTACTTTTTTGTTCCTCAAGT 660
GAAGCGACGATGGGACGTTCTTGAAAAACATGGATACGCCATGAAAAACAAGGGTTCA

661 GCGCGCCGCGGTGGTAAGTCATCCCATGTTGTACCAACGGAGCACCGGGATGGCTGAGAA 720
CGCGCGGCGGCACCATTAGTAGGGTACAACATGGTTGCCTCGTGGCCCTACCGACTCTT

721 GGTCCAAGAACATCTGCGTATCCGCCTGGGGGCTTGCCTCCTGAAGCGGATTGATGCCGA 780
CCAGGTTCTTGTAGACGCATAGGCGGACCCCGAACGGAGGACTTCGCCTAACTACGGCT

781 GCGGGAGAAGAACGGTCGGACCAGGACCGACGAGATCGAGGCGCTTCTTGAGGAAGCGCT 840
CGCCCTCTTCTTGCCAGCCTGGTCCTGGCTGCTCTAGCTCCGCGAAGAACTCCTTCGCGA

841 TCGCAAAAGGGAAATGCGGGAGATCGTGAAGGAAGCTATGCGCGAGGAAATGGCGACATC 900
AGCGTTTTCCCTTTACGCCCTCTAGCACTTCCTTCGATACGCGCTCCTTTACCGCTGTAG

V K G C
901 GGA CTTCTACGAGGCGCTAGTCGGAAAATTCAA AAGGGAGGGCACGAAGTGAAGGGCTGC 960
CCTGAAGATGCTCCGCGATCAGCCTTTTAA GTTTTCCCTCCCGTGCTTCACTTCCCGACG
I K E R S P G H W A I I L D Q R D P A T

961 ATCAAAGAGCGATCACCCGGCCACTGGGCCATTATCCTGGACCAGCGTGATCCGGCCACG 1020
TAGTTTCTCGCTAGTGGGCCGGTGACCCGGTAATAGGACCTGGTCGCACTAGGCCGGTG

G K R K R K W H S F T G T K R A A Q L E
1021 GGCAAGCGCAAGCGGAAGTGGCACAGCTTCA CAGGCACCAAGCGCGCGGCACAGCTTGAG 1080
CCGUUCGCGUUCGCCUUCACCGUGUCGAAGUG UCCGUGGUUCGCGCGCCGUGUCGAACUC

C A R L I S E T S D G A Y V E P S K L A
1081 TGTGCGCGTCTCATCAGCGAAACGTCCGATGG CGCCTATGTGAGCCGTCAAAGCTTGCG 1140
ACACGCGCAGAGTAGTCGCTTTG CAGGCTACCGCGGATACAGCTCGGCAGT**TTCGAA**ACGC

L A Q F F D R W L K H I K P N V S P R T
1141 TTGGCTCAATTCTTTGATCGCTGGCTGAAGC ACATCAAGCCGAACGTCTCGCCGCGCACC 1200
AACCAGTTAAGAACTAGCGACCGACTTCGTGTAGTT CGGCTTGCAGAGCGGCGCGTG

H E R Y E Q I A T K N I V P L L G A K I
1201 CATGAACGTTACGAGCAAATCGCGACCAAGA ACATTGTGCCGCTGCTCGGCGCCAAGATC 1260
GTACTTGCAATGCTCGTTTAGCGCTGGTTCTTGTA ACACGGCGACGAGCCGCGGTTCTAG

L S K L Q P I D I S E A Y G K A L E N G
1261 CTTTCAAAGCTCCAGCCGATT**GATAT**CAGCGAGGCGTATGGCAAGGCATTGGAGAACGGC 1320
GAAAGTTTCGAGGTCGGCTAA**CTATAG**TCGCTCCGCATACCGTTCCGTAACTCTTGCCG

R R D G K G G L S P R T V H H M H R V L
1321 CGGCGGGACGGGAAGGGCGGTTTGTGCGCGCGC ACCGTGCACCATATGCACCGCGTTTTG 1380
GCCGCCCTGCCCTTCCCGCCAAACAGCGGCGCGTGGCACGTGGTATACGTGGCGCAAAAC

F S A L G Q A E R W R L I P R N P A A L
1381 TTTTCGGCCCTTGGGCAAGCCGAGCGCTGGCGC CTGATCCCCGCAACCCGGCTGCCCTG 1440
AAAAGCCGGGAACCCGTTTCGGCTCGCGACCGCGG ACTAGGGGGCGTTGGGCCGACGGGAC

L E K R D R P K I E R K P V R T I D A N
1441 **CTCGAGA**AGCGGGATCGCCCCAAGATCGAGCGCAAGCCGGTCAGGACCATTGATGCG**GAAT** 1500
GAGCTCTTCGCCCTAGCGGGTTCTAGCTCGCGTTTCGGCCAGTCCTGGTAACTACG**CTTA**

S T A A A F D A A R E R A Y L S P V I L
1501 **TCT**ACTGCTGCCGCTTTTCGATGCTGCGCGGGAGCGCGCCTATTTATCCCCCGTGATCCTT 1560
AGATGACGACGGCGAAAGCTACGACGCGCCCTCGCGCGGATAAATAGGGGGCACTAGGAA

A T L C G L R R G E I T A L R W R S V D
1561 GCGACCCTCTGCGGCCTTCGTGCGGGCGAAATCACGGCGCTGCGCTGGCGCTCGGTGGAC 1620
CGCTGGGAGACGCCGGAAGCAGCGCCGCTTTAGTGCCGCGACGCGACCGCGAGCCACCTG

L D N G Q L A V V A S T E Q T D A G T I
1621 CTGGACAACGGTCAGCTGGCCGTGCTGCGGAGCACCGAACAGACGGACGCCGGCACGATC 1680
GACCTGTTGCCAGTCGACCGGCAGCAGCGCTCGTGGCTTGTCTGCCTGCGGCCGTGCTAG

R E K E A K S G R A R T I A M P A M A V
1681 CGCGAGAAGGAAGCTAAGAGCGGCCGCGCGGTACGATCGCGATGCCGGCAATGGCTGTC 1740
GCGCTCTTCCTTCGATTCTCGCCGGCGCGCGCATGCTAGCGCTACGGCCGTTACCGACAG

E E L R R W R V M Q A E E L L R L G V R
1741 GAGGAGCTGCGGCGCTGGCGGGTCATGCAGGCTGAGGAAGTCTTCGCCTCGGTGTGCGC 1800
CTCCTCGACGCCGCGACCGCCAGTACGTCCGACTCCTTGACGAAGCGGAGCCACACGCG

G D D D R H V V T Q A D G S P L Q P R S
1801 GGCGACGATGACCGGCATGTGGTCACCCAGGCGGACGGCTCGCCGCTCCAGCCTCGCAGC 1860
CCGCTGCTACTGGCCGTACACAGTGGGTCCGCCTGCCGAGCGGCGAGGTGCGAGCGTTCG

L T H S V S E F L K E W R V T L H G L R
1861 CTCACACACTCCGTTTCCGAGTTCCTGAAAGAATGGCGGGTCACGCTCCACGGCCTCCGG 1920
GAGTGTGTGAGGCAAAGGCTCAAGGACTTTCTTACCGCCCAGTGCGAGGTGCCGGAGGCC

H S H A S H M L A S N I H P K I V Q E R
1921 CACAGCCACGCCAGCCACATGCTGGCCTCGAACATCCATCCCAAGATCGTGCAGGAGCGG 1980
GTGTCGGTGCGGTGCGGTGTACGACCGGAGCTTGTAGGTAGGGTTCTAGCACGTCCTCGCC

L G H S S I A I T M D I Y S H L M P N M
1981 CTGGGCCATTCTCAATCGCGATCACGATG**GATATC**TACAGTCATCTGATGCCGAACATG 2040
GACCCGGTAAGGAGTTAGCGCTAGTGCTAC**CTATAG**ATGTCAGTAGACTACGGCTTGTAC

Q G E A A A A V D V A M R A A I N K R T
2041 CAGGGCGAGGCCGCCGCGCGGTTGACGTCGCCATGCGCGCCGCCATAAACAAGCGAACC 2100
GTCCCGCTCCGGCGGCGCCGCAACTGCAGCGGTACGCGCGGCGGTATTTGTTGCTTGG

D D V G *
2101 GACGACGTTGGGTAGCAAAGCGGTAGCAGAGTCCACGGAACGACGAAAAGCTAAACAATT 2160
CTGCTGCAACCCATCGTTTCGCCATCGTCTCAGGTGCCTTGCTGCTTTTCGATTTGTAA

2161 TCAAGGCTTGGAAGGGTGGCCGAGTGGTTTAAGGCACCGGTCTTGAAAACCGGCGTGCCT 2220
AGTTCCGAACCTTCCCACCGGCTCACCAAATTCGTGGCCAGAACTTTTGGCCGCACGGA

2221 GCAAGGGTACCGTGGGTTCGAATCCCACCCCTTCCGCCAGTTTCGACCGAAATGTGTAGG 2280
CGTTCCCATGGCACCCAAGCTTAGGGTGGGGAAGGCGGTCAAAGCTGGCTTTACACATCC

2281 GCCGAACCTTTGGGCGGCCGGTTTACGCCGGCGGGCCTCCTTTAAAATTCGTTAGTTGGGG 2340
CGGCTTGAAACCCGCGGCCAAGTGCGGCCGCCGAGGAAATTTTAAGCAATCAACCCC

2341 GTGCTGCCGCTCTTGGCCTTGGACGAATGTTTCACTACTGATTTAGGCGGTGCGGCCCCG 2400
CACGACGGCGAGAACCGBAACCTGCTTACAAAGTGATGACTAAATCCGCCACGCCGGGCG

2401 TTCTTCGACGCTTCGTGCGCCGCGGGCAGTTCCCCACGGATCTACGGCCTTTTGGTCAGGA 2460
AAGAAGCTGCGAAGCAGCGGCGCCCGTCAAGGGGTGCCTAGATGCCGGAACCAAGTCCT

2461 ACGTTGCCGAGGGAGCGTTGATAGGCGCGCTCAGCCCGAATGTCGTCCGCCTTCTGCGTC 2520
TGCAACGGCTCCCTCGCAACTATCCGCGCGAGTCGGGCTTACAGCAGGCGGAAGACGCAG
* G S H R G G E A D

2521 TCCGTCTTGTCTGGGACTGTTGCCATACATTGGAACATGGTCCTGCGCCAATGCGGTC 2580
AGGCAGAACAGGACCCTGACAAGCGGTATGTAACCTTGTACCAGGACGCGGTTACGCCAG
G D Q G P V T R W V N S C P G A G I R D

2581 GGTGCGATCAGAGCAAACATGACAGCGACGGCGATTTTGCGCATCGAGAAAACCCCCGGT 2640
CCACGCTAGTCTCGTTTGTACTGTCGCTGCCGCTAAAACGCGTAGCTCTTTTGGGGGCCA
T R D S C V H C R R R N Q A D L F G G T

2641 TCTGCGACGAGCATAACATCGCGCCGATTGCGGCATCAATGGGCGCGGTTTGACAGACAC 2700
AGACGCTGCTCGTATTGTAGCGCGGCTAACGCCGTAGTTACCCGCGCCAACTGTCTGTG
R R R A Y C R A S Q P M L P R P K V S V

2701 CCCTTCCGCCATACGATCGGTGCGGCGTTCCCGGGCAGGTAATCGGTGAACCAGACGTCC 2760
GGGAAGGCGGTATGCTAGCCAGCCGCAAGGGCCCGTCCATTAGCCACTTGGTCTGCAGG
G E A M R D T P R E R A P L R H V L R G

2761 AATCCGGCCGCGCTCGACAAGCTCAAGCTTCGTATCCAGGCGTTGCGCGCCAAGACGATC 2820
TTAGGCCGGCGCGAGCTGTTTCGAGTTCGAAGCATAGGTCCGCAACGCGCGGTTCTGCTAG
I R G R E V L E L K T D L R Q A G L R D
M A A P R K R R C R P P P R S P S C W

2821 GCCAATGGCTGCACCGAGGAAGAGGCGCTGTGCGGCCGCCAAGGTGCGCGAGCTGCTG 2880
CGGTTACCGACGTGGCTCCTTCTCCGCGACAGCCGGCGGGGTTCCAGCGGCTCGACGAC
G I A A G L F L R Q R G G G L D G L Q Q

I A T I C R S P T S T C G R R R A N G G
2881 GATCGCCACGATTTGTGCTCTCCGAC**GTCGAC**CTGCGGGCGTCGCCGTGCGAACGGAGG 2940
CTAGCGGTGCTAAACAGCGAGAGGCT**GACGCTGG**ACGCCCCGAGCGGCACGCTTGCCTCC
I A V I Q R E G V D V Q P R R R A F P P
S L R P I A R S E F L W T I A S A R L L
2941 GTCTTTGAGACCCATCGCAAGAAGC**GAATTC**CTCTGGACGATTGCATCGGCGCGCTTGCT 3000
CAGAAACTCTGGGTAGCGTTCTTCG**CCTTAAG**GAGACCTGCTAACGTAGCCGCGCGAACGA
D K L G M
I S A I V G S G A R R M R P A R A A M C
3001 CATTTCTGCGATTGTGCGGTCTGGCGCGAGAAGAATGCGGCCGGCGAGAGCAGCTATGTG 3060
GTAAAGACGCTAACAGCCCAGACCGCGCTCTTCTTACGCCGGCCGCTCTCGTCGATACAC

S L V S A R M S R S R I I W R N *
3061 TTCTTTGGTCTCGGCGCGGATGTGCGAGGTGCGGCATTATCTGGCGGAATTGATCGACGGC 3120
AAGAAACCAGAGCCGCGCCTACAGCTCCAGCGCGTAATAGACCGCCTTAAGCTAGCTGCCG

3121 GCCGTGCGCGCCGAGCTTGGTCGCTTCAAGACCTCG**GTCGACT**ACAGCAGGTTCCGGCAC 3180
CGGCACGCGCGGCTCGAACAGCGAAGTTCTGGAGC**CAGCTG**ATGTCGTCCAAGGCCGTG

M P P S R S A W W R Q S R T
3181 CAGGAGCGGCATCTGGCCAATGCCTCCTTCGCGCTCGGCATGGTGGCGTCAATCGCGGAC 3240
GTCCTCGCCGTAGACCGGTTACGGAGGAAGCGCGAGCCGTACCACCGCAGTTAGCGCCTG

G Y R R S R P V A I R S T K A P V A G W
3241 AGGCTACAGGCGATCAAGGCCGGTCGCGATCAGGTCAACGAAAGCACCGGTGCGGGGCTG 3300
TCCGATGTCCGCTAGTTCCGGCCAGCGCTAGTCCAGTTGCTTTTCGTGGCCAGCGCCCGAC

S C S R P R W S M P N S T S S T S S S G
3301 GTCGTGCTCAAGACCTCGGTGGTCGATGCC**GAATTC**GACAAGCTCGACCTCAAGCTCCGG 3360
CAGCACGAGTTCTGGAGCCACCAGCTACGG**CCTTAAG**CTGTTTCGAGCTGGAGTTTCGAGGCC

P S A A P A G W C R W R P M K P A A P R
3361 ACCCAGCGCAGCACCGGCCGGATGGTGTGATGGCGGCCTATGAAGCCGGCGGCGCCGCG 3420
TGGGTGCGGTCTGTGGCCGGCCTACCACAGCTACCGCCGATACTTCGGCCGCCGCGGCGC

A G R W P S I P A L A R R S Q G P L P K
3421 GGCGGGTCGCTGGCCATCAATCCCGGCCTTGGCGAGGCGCAGTCAGGGACCACTCCCAAA 3480
CCGCCCAGCGACCGGTAGTTAGGGCCGGAACCGCTCCGCGTCAGTCCCTGGTGAGGGTTT

D A D R I G A R D D A P M Y F G I I A A
3481 GGACGCTGATCGCATCGGGGCAAGGGACGATGCGCCGATGTATTTTCGAATAATAGCAGC 3540
CCTGCGACTAGCGTAGCCCCGTTCCCTGCTACGCGGCTACATAAAGCCTTATTATCGTCG

Y P C F A R R A K G P C G G G T P K L L
3541 ATACCCCTGTTTTGCCCGACGTGCCAAAGGGCCTTGCGGGGGTGGGACGCCCAAGCTGTT 3600
TATGGGGACAAAACGGGCTGCACGGTTTCCCGGAACGCCCCACCCTGCGGGTTCGACAA

I P N A L A T V H G V A F E N S S G P R
3601 GATCCCAAACGCATTGGCTACTGTGCATGGGGTTGCTTTTCGAAAATTCCAGCGGGCCGCG 3660
CTAGGGTTTGC GTAACCGATGACACGTACCCCAACGAAAGCTTTTAAGGTCGCCCCGGCGC

R N A R S S A L S R R A Q R N R S S R L
3661 CCGAAATGCCCGCTCGTCGGCGTTAAGCCGGCGCGCGCAAAGAAATAGGTCGAGCCGGCT 3720
GGCTTTACGGGCGAGCAGCCGCAATTCGGCCGCGCGCTTTCTTTATCCAGCTCGGCCGA

S M A P L T I *
3721 CTCGATGGCGCCTCTAACTATCTGATATTTTCGTTTCTTTATTTCGGTTGCGGCAGGGCTTC 3780
GAGCTACCGCGGAGATTGATAGACTATAAAGCAAAGAAATAAGCCAACGCCGTCCCGAAG

3781 CGGTTTCGGTTCGGGGAACCTCTTTCGCTGCGTCCGCGTTGTCTTGCCATGACCGAAGATCT 3840
GCCAAGCCAAGCCCCTTGAGAAAGCGACGCAGGCGCAACAGAACGGTACTGGCTTCTAGA

M R H A G
3841 TTCCTTCCGACGCAAACCCTTGACCCCCGAACAGCGTCAGGCGCGCGATGCGGCACGCCG 3900
AAGGAAGGCTGCGTTTGGGAACTGGGGGCTTGTCGCAGTCCGCGCGCTACGCCGTGCGGC

S R L K R P C A T T R R R R S S S T P T
3901 GATCGAGGCTGAAAAGGCCATGCGCGACCACGAGGAGGCGCAGAAGCAGTTCTACGCCAA 3960
CTAGCTCCGACTTTTCCGGTACGCGCTGGTGCTCCTCCGCGTCTTCGTCAAGATGCGGTT

R N G C G P S G S H A K Q R R Q R T D R
3961 CAAGGAACGGCTGCGGGCCGAGCGGCTCGCACGCGAAGCAGCGACGGCAAAGGACTGACC 4020
GTTCTTGGCCAGCCCCGGCTCGCCGAGCGTGCGCTTCGTGCTGCCGTTTCTGACTGG

T R S P R Q N L R M D I P A G P D L V P
4021 GAACGCGGTGCGCGGCCAGAACCTCCGGATGGATATTCCAGCCGGGCCGGACCTAGTGC 4080
CTTGCGCCAGCGGCGCGGTCTTGAGGCGCTACCTATAAGGTCGGCCCGGCCTGGATCAG

L R R A E G E L E R L D G A C Q C P A G
4081 CGTTGCGTCGTGCTGAAGGCGAGCTTGAGCGCCTGGACGGCGCCTGCCAATGCCCCGCGG 4140
GCAACGCAGCACGACTTCCGCTCGAACTCGCGGACCTGCCGCGGACGGTTACGGGGCGCC

R L G L D R F G C D A A I V G D L E Q S
4141 GGCGATTGGGCCTCGATCGCTTCGGCTGCGATGCGGCAATCGTCGGCGACCTTGAGCAGT 4200
CCGCTAACCCGGAGCTAGCGAAGCCGACGCTACGCCGTTAGCAGCCGCTGGAACCTCGTCA

V S C K V H G G E G G L L Q A D P F K P
4201 CCGTGTGCTGCAAGGTCCATGGTGGAGAGGGCGGCCTGCTCCAGGCAGACCCGTTCAAGC 4260
GGCACAGCACGTTCCAGGTACCACCTCTCCCGCCGGACGAGGTCCGTCTGGGCAAGTTTCG

S K L P Q L S V H A S A L D V P G L C G
4261 CGTCGAAACTCCCGCAGCTCTCTGTTTCATGCGTCAGCTCTCGATGTCCCCGGGCTATGCG 4320
GCAGCTTTGAGGGCGTCGAGAGACAAGTACGCAGTCGAGAGCTACAGGGGGCCCGATACGC

A E S T *

4321 GCGCTGAGTCCACTTAACAAAGAGTAAACGCTTTCTCTGTAGCCGGTCTGGCTGGCGCGGA 4380
CGCGACTCAGGTGAATTGTTTCTCATTTGCGAAAGGACATCGGCCAGACCGACCGCGCCT

4381 GCTGGCCGGCTGCCGTGATGGCCGGCCCTGCGCAAGCGGCGGGCTTGACGGCGTTTGGCT 4440
CGACCGGCCGACGGCACTACCGGCCGGGACGCGTTTCGCCGCCCGAACTGCCGCAAACCGA

4441 TCCGCCGGAAGATTCAAATGATCCTCAACTGACGTGAAAGACGGAGACGTTTCGCTCCCAG 4500
AGGCGGCCTTCTAAGTTTACTAGGAGTTGACTGCACTTTCTGCCTCTGCAAGCGAGGGTC

M T T F D K R

4501 CCAGTCCGATCCGCAGCAGCGAAAACGAAATGGAGCTGACCATGACCACGTTTCGACAAGC 4560
GGTCAGGCTAGGCGTCGTCGCTTTTGCTTTACCTCGACTGGTACTGGTGCAAGCTGTTTCG

E Q G F E A K F A H D E E L I F K A T A

4561 GCGAGCAGGGCTTTGAAGCCAAATTCGCCCACGACGAGGAGCTCATATTCAAGGCCACGG 4620
CGCTCGTCCCGAAACTTCGGTTTAAGCGGGTGCTGCTCCTCGAGTATAAGTTCCGGTGCC

R S N K L L G L W P P A S S G S A R C R

4621 CCCGGTCAACAAGCTGCTCGGGCTCTGGCCGCCGGCCAGCTCGGGCTCAGCGCGATGCC 4680
GGGCCAGCTTGTTTCGACGAGCCCGAGACCGGCGGCGCGGTTCGAGCCCGAGTCGCGCTACGG

Q E L F H G A G D G P S G E P D D G R G

4681 GCCAAGAGCTATTCCACGGCGCTGGCGACGGACCATCTGGAGAGCCGGACGATGGACGAG 4740
CGGTTCTCGATAAGGTGCCGCGACCGCTGCCTGGTAGACCTCTCGGCCTGCTACCTGCTC

P G Q G V R R S R R Q G G G A R A G R R

4741 GTCCTGGACAAGGTGTCAGGCGATCTCGCCGCCAAGGGGTGGCGCGCGAGCAGGTCGCC 4800
CAGGACCTGTTCCACAGTCCGCTAGAGCGGCGGTTCCCCACCGCGCGCTCGTCCAGCGG

E V P G M P A S G H S T T R S Q R V S A

4801 GCGAAGTTCCAGGAATGCCTGCATCAGGCCATTCAACAACCTCGAAGCCAAAGAGTGAGCG 4860
CGCTTCAAGGTCCTTACGGACGTAGTCCGGTAAGTTGTTGAGCTTCGGTTTCTCACTCGC

A Q L G A H S S M W T I S M G S P P R L

4861 CCGCGCAGTTAGGCGCTCACAGCTCCATGTGGACGATCTCGATGGGCTCGCCGCCGAGGC 4920
GGCGCGTCAATCCGCGAGTGTGAGGTACACCTGCTAGAGCTACCCGAGCGGCGGCTCCG

*

4921 TGTGAGAGAACTGCCCTCTGCCAGGCGGTGGGGCGCAAGGTGAGCGGGCTGGTCCTACTC 4980
ACACTCTCTTGACGGGAGACGGTCCGCCACCCGCGTTTCCACTCGCCCGACAGGATGAG

* E

4981 GGCATGCTTGTTGCGCATTCCGGAATCGCTGAGCTT**GTCGAC**GTAGGCGATGCCTAGCGC 5040
CCGTACGAACAACGCGTAAGGCCTTAGCGACTCGAA**CAGCTG**CATCCGCTACGGATCGCG

A H K N R M G S D S L K D V Y A I G L A

5041 CGAGACGATGAAGGTGATGTGGATCAGCACCTGCCACATCACGCCGGTCTCGGTGAAGCC 5100
GCTCTGCTACTTCCACTACACCTAGTCGTGGACGGTGTAGTGC GGCCAGAGCCACTTCCGG
S V I F T I H I L V Q W M V G T E T F G

5101 GGCGCGGTTTCGAGCCGAGATTGCCGGCCTCGATGAAGGTGCGGAGCAGTGC GATCGAGGA 5160
CCGCGCCAAGCTCGGCTCTAACGGCCGGAGCTACTTCCACGCCTCGTCACGCTAGCTCCT
A R N S G L N G A E I F T R L L A I S S

5161 GATGCCGATGATGGCCATGGCA**AAGCTT**GATCTTCAGCACGCTCGCATTGACGTGGCCGAG 5220
CTACGGCTACTACCGGTACCG**TTCGAA**CTAGAAGTCGTGCGAGCGTAACTGCACCGGCTC
I G I I A M A L K I K L V S A N V H G L

5221 CCATTCCGGCTCGTCGGGATGGCCCTGGAGATCGAGCCGCGAAACGAACGTCTCGTAGCC 5280
GGTAAGGCCGAGCAGCCCTACCGGGACCTCTAGCTCGGCGCTTTGCTTG CAGAGCATCGG
W E P E D P H G Q L D L R S V F T E Y G

5281 GCCGACGATGACCATCACCAGCAGATTGGAGATCATCACGACGTCGATCAGCGCCAGCAC 5340
CGGCTGCTACTGGTAGTGGTCGTCTAACCTCTAGTAGTGCTGCAGCTAGTCGCGGTCTGTG
G V I V M V L L N S I M V V D I L A L V

5341 GCTCATCATGATCTGCTGTTTCGGTGAGATCGAGGGCGTGCCAGGACAGATGCCAGAGCTC 5400
CGAGTAGTACTAGACGACAAGCCACTCTAGCTCCCGCACGGTCCTGTCTACGGTCTCGAG
S M M I Q Q E T L D L A H W S L H W L E

5401 CTTGAGGAACAGCGCGATGTAGACGCATTGCGCCACGATCAGTCCGAGATAGAGCGGCAG 5460
GAACTCCTTGTCGCGCTACATCTGCGTAACGCGGTGCTAGTCAGGCTCTATCTCGCCGTC
K L F L A I Y V C Q A V I L G L Y L P L

5461 TTGCAGCCAGCGCGAGCCGAAGATGATCATCGGCAGCAGGCCGAGGCGCGGCGAGGGCGG 5520
AACGTCCGTTCGCGCTCGGCTTCTACTAGTAGCCGTGTCGCGGCTCCGCGCCGCTCCCGCC
Q L W R S G F I I M P L L G L R P S P P

5521 GCGGGCCTCGGTCTGTTGGGGCAGGCTCAACCGACATTCAAGCAGCATCCTCGCATCGAGA 5580
CGCCCCGAGCCAGCACCCCCGTCCGAGTTGGCTGTAAGTCCGTCTAGGAGCGTAGCTCT
R A E T T P A P E V S M

5581 TGATCTGGCTTTTCATGTAGCCCGGCAAGATGGCCGGCGAAAGACGCGCGGTGCGCTTGCA 5640
ACTAGACCGAAAGTACATCGGGCCGTTCTACCGGCCGCTTTCTGCGCGCCACGCGAACGT

5641 GCCTTCCGGGGATCGTGCCGTTTTCGTGCTACCGTGCCGGGCGGCCGTGCGACGGCCTGG 5700
CGGAAGGCCCTAGCACGGCAAAGCACGATGGCACGGCCCCCGGCAGCGCTGCCGGACC

5701 ATCGCGGGAGGCGGGACGTGCGGAGCGGCTTTAGCAGTGGGCCCCGGGAGGATCGCGCTTG 5760
TAGCGCCCTCCGCCCTGCACGCCTCGCCGAAATCGTCAACCGGGCCCTCCTAGCGCGAAC

5761 TTGCGGCGATAATGATGCTTGGCGGGGCGAGGTGTCTGGCTACGCCGTTGACGCCGTTTC 5820
AACGCCGCTATTACTACGAACCGCCCCCGCTCCACAGCCGATGCGGCAACTGCGGCAAAG

5821 GCTACGAGGCGCAAGCGCAGCGCCATTGTCCGCATGACAAGGTGGTCTGGCTGGATTTCA 5880
CGATGCTCCGCGTTCGCGTCGCGGTAACAGGCGTACTGTTCCACCAGACCGACCTAAAGT

5881 GGAAGGGCGTCTACTACGCCAGGGGCCAGAAGCGATACGGCCAGGGTTTTGACGGCAGCT 5940
CCTTCCCGCAGATGATGCGGTCCCCGGTCTTCGCTATGCCGGTCCAAAACTGCCGTGCA

5941 TCGTTTGCCTCGGCGAGGCCCGCGACAGCTTCTATCGTCGCTCGCTGCTCGGCCTGCGCT 6000
AGCAAACGGAGCCGCTCCGGGCGCTGTCTGAAGATAGCAGCGAGCGACGAGCCGGACGCGA

6001 GAGCGGCGCGCGACGGAGCGCGAAAACGATCCGGCCTATTTCCGGTCGGGCAGCTTCACC 6060
CTCGCCGCGCGCTGCCTCGCGCTTTTGCTAGGCCGGATAAAGGCCAGCCCGTCGAAGTGG

6061 GGGATATGCGGGGAGGTGCTGATGACCCTTGGACTTCCGTCCGGATAGGTCCGGCCGCCG 6120
CCCTATACGCCCTCCACGACTACTGGGAACCTGAAGGCAGGCCTATCCAGGCCGGCGGC

6121 CGGATCAGCGATTCCAGGACCAGGAAGAATTTCTCGGCAAGCATTGCGTCACCTTCGTTG 6180
GCCTAGTCGCTAAGGTCCTGGTCCTTCTTAAAGAGCCGTTTCGTAACGCAGTGGAAGCAAC

6181 GTGATGGCCTCTTGAAATGAGTCGAGGCGCCGAACGCGGAAATTCAATCAACTAAACGGG 6240
CACTACCGGAGAACTTTACTCAGCTCCGCGGCTTGCGCCTTTAAGTTAGTTGATTTGCC

6241 AGCGGGACAATTCCGGGACAAACACCCGTGTTGCGGGGCAGTACGGTCGTGGTCGGAAAC 6300
TCGCCCTGTAAAGGCCCTGTTTGTGGGCACAACGCCCGTCATGCCAGCACCAGCCTTTG

6301 ACCGGGAAAGGGGGCTGTGATCAGCCGAAGGCCAACGCCACCAGG**CTCGAG**CACAACAGC 6360
TGGCCCTTTCCCCGACACTAGTCGGCTTCCGGTTGCGGTGGTCC**GAGCT**CGTGTTGTCG

6361 ACCAGACCGCTGCGGTCAATGCCAGGAAGCCATCGGATACGAGGTCATGGTTACGCATTG 6420
TGGTCTGGCGACGCCAGTTACGGTCCTTCGGTAGCCTATGCTCCAGTACCAATGCGTAAC

6421 GACACCTGCCGCTCTCGTCTGCGATGCTCGATCGGATCGCTTGAAATTGCCGAACGTCC 6480
CTGTGGACGGCGAGAGCAGACGCTACGAGCTAGCCTAGCGAACTTTAACGGGCTTGACAGG

```
6481 CGTCTTGAAAGAGGTGATGCTTGCCGCCCCGCGCGAGTGCCTCAGGCCCTCGTACGGTAAC 6540
      GCAGAACTTTCTCCACTACGAACGGCGGGCGCGCTCACGGAGTCCGGGAGCATGCCATTG

6541 CTTCAAACGCATGGGCCAGGAAGATCCCCGCGCTTACCAGACCCATCAGTGCCGAAACCG 6600
      GAAGTTTGCGTACCCGGTCCTTCTAGGGGCGCGAATGGTCTGGGTAGTCACGGCTTTGGC

6601 TCTCGATCATCGTTAAATTCAAATCCCGCCCTTGTCATGCGAGAGAACGCGTGCGGCCTT 6660
      AGAGCTAGTAGCAATTTAAGGTTTAGGGCGGGAACGTACGCTCTCTTGCGCACGCCGGAA

6661 GCACAGTCAAAGAATTC 6678
      CGTGTCAGTTTTCTTAAG
```

Abb.22: Nukleotidsequenz eines 6678 bp großen DNA-Fragmentes aus dem Genom von *B. japonicum* 110*spc4*. Für die Bereiche mit hoher Kodierwahrscheinlichkeit wurde jeweils die abgeleitete AS-Sequenz angegeben. Die Sequenz ist in den Datenbanken des NCBI unter der Accession Number AF200320 einzusehen.

Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Sal*I und *Xho*I sind durch Fettdruck hervorgehoben.

3.4.5. Computergestützte Analyse der abgeleiteten Aminosäure Sequenzen

Innerhalb der erhaltenen DNA-Sequenz konnten mit Hilfe der Computerprogramme Genmon 4.3 und GeneCompar 1.3 sieben offene Leserahmen (ORFs) identifiziert werden. Die selektierenden Faktoren waren das Vorhandensein eines Startkodons mit einer entsprechenden Shine-Dalgarno-Sequenz und ein Stopkodon.

In Abb.23 sind die ORFs in ihrer Leserichtung und ihrer relativen Lage zu der *TnphoA*-Insertion in *B. japonicum* 2-10 dargestellt. Die Länge der abgeleiteten AS-Sequenz konnte berechnet werden, wie auch das mögliche Gewicht des jeweiligen potentiellen Genproduktes.

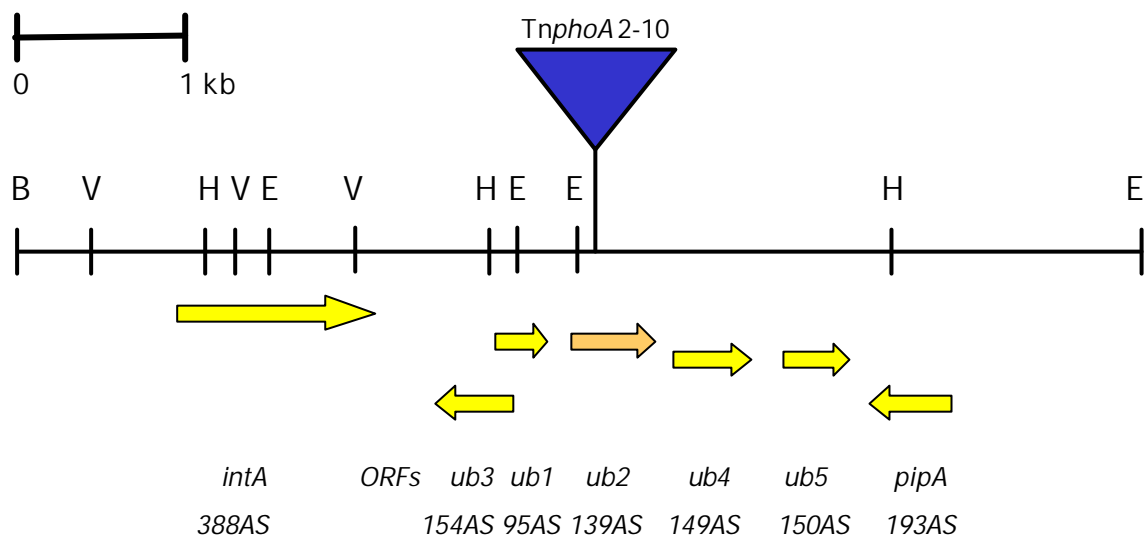


Abb.23: Graphische Darstellung der untersuchten genetischen Region aus dem Genom von *B. japonicum* 110spc4. Sieben ORFs sind in der 6,7 kb langen DNA-Sequenz enthalten, symbolisiert durch Pfeile. Die Orientierung des Pfeils gibt die Leserichtung des jeweiligen ORFs an. Die unterschiedlichen Leseraster werden durch die Höhenverschiebung der Pfeile dargestellt. *TnphoA*-2-10 lokalisiert die Insertion in *B. japonicum* 2-10.

Die Länge der abgeleiteten AS-Sequenz ist direkt unter der Bezeichnung des ORFs angegeben.

Die kb-Angaben definieren nur die Größenrelation innerhalb des dargestellten DNA-Bereiches, sie stellen keine Einordnung in das Genom dar.

Die Vergleiche der identifizierten ORFs mit den Sequenzen in den Datenbanken des NCBI ergaben keinen Aufschluß bezüglich möglicher Funktionen oder Zugehörigkeiten zu bekannten Gen-Familien für die ORFs *ub1*, *ub 2*, *ub 3*, *ub 4* und *ub 5*.

Für die ORFs *pipA* und *intA* dagegen konnten sehr klare Aussagen anhand der verschiedenen Datenbanken des NCBI gemacht werden.

A)

Organismus	Genprodukt mit Sequenzähnlichkeit	Acc.No.	Gesamtlänge/ AS	Überlappung/ AS	Identität/ %	Ähnlichkeit/ %
<i>Ralstonia solanacearum</i>	potentielles Transmembran-Protein	NC_003295	179	171	58	75
<i>Pasteurella multocida</i>	hypothetisches Protein	NC_002663	192	172	55	70
<i>Haemophilus influenzae</i>	konserviertes hypothetisches Membran-Protein	NC_000907	183	172	52	70

B)

Organismus	Genprodukt mit Sequenzähnlichkeit	Acc.No.	Gesamtlänge/ AS	Überlappung/ AS	Identität/ %	Ähnlichkeit/ %
<i>Mesorhizobium loti</i>	Bakteriophagen Integrase	NC_002678	399	383	50	63
<i>Bacillus anthracis</i> Stamm A2012	Phagen Integrase	NC_003995	374	370	31	51
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sss (λ Integrase)	Y12268	299	190	29	42

Tab.02: Darstellung der Homolgien der abgeleiteten AS Squeuzen der ORFs *pipA* (A) und *intA* (B) aus *B. japonicum* 110spc4 mit den Genprodukten verschiedener Organismen aus den Datenbanken des NCBI. Die Berechnungen bezüglich Ähnlichkeit und Identität erfolgten nach Karlin und Altschul (1990 und 1993).

A) Ähnlichkeit mit PipA aus *B. japonicum* 110spc4, Länge: 193 AS.

B) Ähnlichkeit mit IntA aus *B. japonicum* 110spc4, Länge: 388 AS.

Der ORF *pipA* wies deutliche Ähnlichkeit mit den Genen konservierter potentieller Proteine der inneren Membran verschiedener Mikroorganismen auf, von denen die höchsten in der Tabelle Tab.02 aufgelistet wurden.

Laut der NCBI Datenbank konservierter Domänen gehört PipA zu einer uncharakterisierten Proteinfamilie, 164 der 193 AS zeigen dies mit einem 97 %igen Alignment.

Darüberhinaus konnte die Berechnung des Hydropathie-Index des potentiellen Genproduktes PipA nach Kyte und Doolittle (1982) das Vorkommen von vier transmembranen Bereichen in der Sekundärstruktur voraussagen (Abb.24), bei denen es sich nach den Berechnungen des Helix-Profiles nach Rao und Argos (1986) um α -Helices handelt. Es kann keine Aussage getroffen werden, in welcher Richtung diese Helices verlaufen und damit auch nicht, welche Bereiche des Genproduktes im Cyto- und welche im Periplasma lokalisiert sind (Abb.24). Auch diese strukturellen Daten deckten sich mit den Angaben zu den homologen Genen, die in den Datenbanken enthalten waren.

Diese Daten gaben zwar keinen Aufschluß über die Funktion des möglichen Genproduktes PipA, aber sie deuteten daraufhin, daß es sich bei *pipA* um ein Gen handelt.

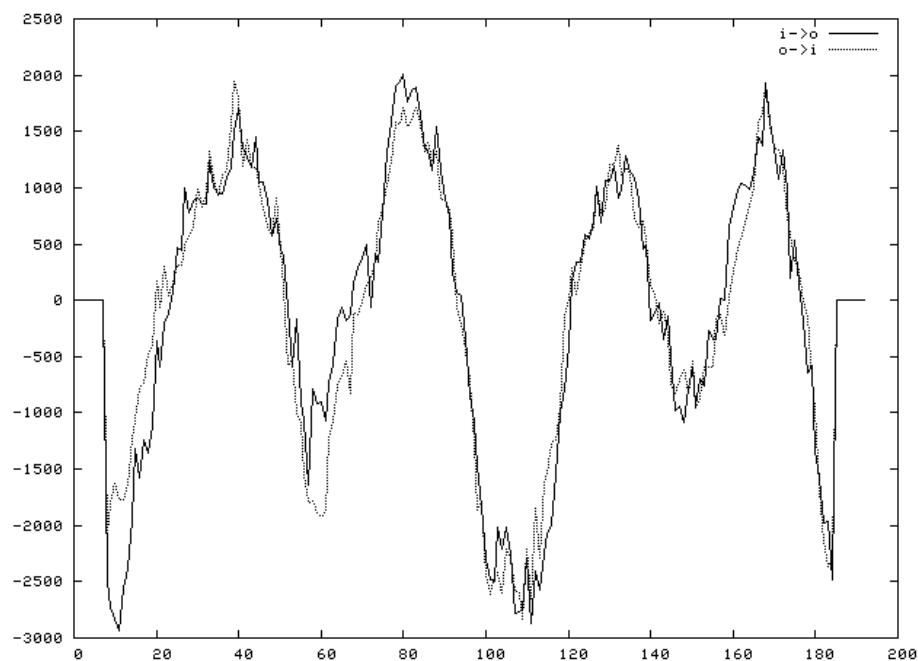


Abb.24: Darstellung der möglichen transmembranen Helices, die PipA ausbildet, berechnet anhand der abgeleiteten AS-Sequenz von *pipA*, nach Rao und Argos (1986). Auf der x-Achse ist die AS-Sequenz von AS 1-193 aufgetragen. Es konnten vier transmembrane Helices identifiziert werden (mittels ch.embnet.org/index.html im world wide web).

Der ORF *intA* zeigte im Sequenzvergleich deutliche Übereinstimmungen mit Integrase Genen verschiedener Organismen, von denen die wichtigsten in der Tabelle Tab.02 aufgelistet wurden.

Über eine Länge von 383 AS konnte eine Ähnlichkeit von 63 % und eine Identität von 50 % mit einer Bacteriophagen-Integrase aus *Mesorhizobium loti* berechnet werden (Abb.25), diese große Übereinstimmung lieferte damit Aufschlüsse über die mögliche Funktion des potentiellen Genproduktes IntA.

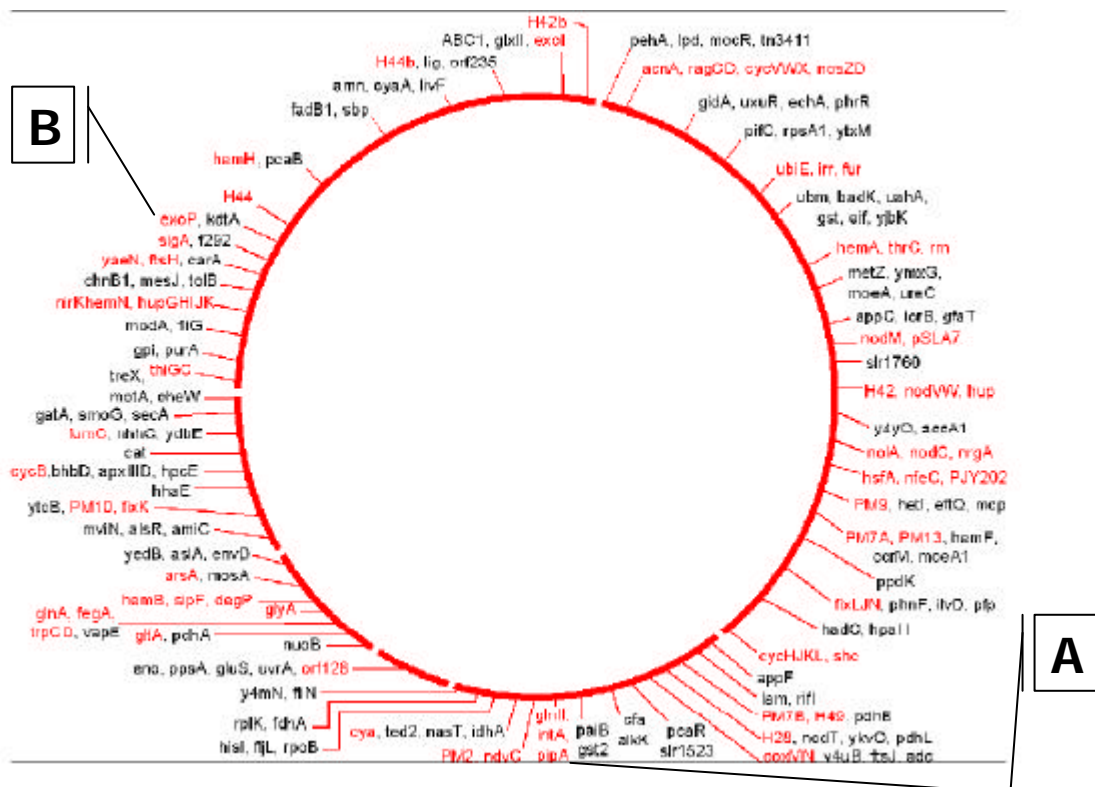
<i>B.j.</i> : 1	VKGCIKERSPGHWAIILD--QRDPATGKRKRKWSFTGTGRRAQLECARLISETSDGAYV 58
	+KG I+ERSPGHWAI+LD + DP TKG+KRKWSFTGTGR AQ EC+RLI+ G YV
<i>M.l.</i> : 1	MKGHIRERSPGHWAIVLVDVGEVDPKTGKKRKRKWSFTGTGRKREAQKECSRLITVLDQGLYV 60
<i>B.j.</i> : 59	EPSKLALAQFFDRWLKHIKPNVSPRTHERYEQIATKNIVPLLGAKILSKLQPIDISEAYG 118
	EP+K +A+F + WL +KP+V+P+THERY +I K + PL+G ILSKL+ I A+
<i>M.l.</i> : 61	EPTKQTVAEFLNEWLAFVKPSVAPKTHERYTEICRKGLSPLIGNVILSKLKTDRIDAAFT 120
<i>B.j.</i> : 119	KAL-----ENGRRDGKGGLSPRTVHHMHRVLFSAALGQAERWRLIPRNPAALEKRD 169
	AL + +R+ L+PRTVHH RVL ALGQA W + RNPA
<i>M.l.</i> : 121	TALTAPRVDHRTKKDQREPLPPLAPRTVHHYRRVLVKALGQAVTWERLSRNPATATTP-- 178
<i>B.j.</i> : 170	RPKIERKPVRTIDXXXXXXXXXXXXXXXXXVILATLCGLRRGEITALRWSVDLDNG- 228
	PK+ER+ + D PV+LA CGLRRGEI ALRWR ++L +
<i>M.l.</i> : 179	-PKVERQKMLAYDVGQTATLLETLPTRMFVPVLLAVTCGLRRGEILALRWRHLELGDNR 237
<i>B.j.</i> : 229	-QLAVASTEQTDAQTIREKEAKSGRARTIAMPAMAVEELRRWRVMAEELLRLGVRGDD 287
	Q+++ S EQT G +R KE KSGRART+A+ A V EL+ R QAEE LRLG+R D
<i>M.l.</i> : 238	RQMSIEESAQTADG-VRYKEPKSGRARTVALSASTVAELKAHRARQAEEQLRLGIRPDA 296
<i>B.j.</i> : 288	DRHVVTQADGSPLQPRSLTHSVSEFLKEW---RVTLHGLRHSHASHMLASNIHPKIVQER 344
	D VV Q DG PLQPRSLTH L + R+ H LRH+HA+ ML++ +HPKI ER
<i>M.l.</i> : 297	DSFVVAQVDGQPLQPRSLTHEWVRVLGKTSLPRIRFHDLRHTHATQMLSAGVHPKIASER 356
<i>B.j.</i> : 345	LGHSSIAITMDIYSHLMPNMQGE 367
	LGHS+I IT+D+YSH+MP MQ +
<i>M.l.</i> : 357	LGHSNIGITLDLYSHVMPGMQAD 379

Abb.25: Vergleich der AS-Sequenz des 388 AS langen potentiellen Genproduktes von *intA* aus *B. japonicum* 110*spc4* (*B.j.*) mit einer 399 AS langen Bakteriophagen Integrase von *Mesorhizobium loti* (*M.l.*). Ein konservierter Aminosäureaustausch ist durch ein + gekennzeichnet. Horizontale Striche überbrücken Bereiche, in denen nur in einer der AS-Sequenzen zusätzliche AS vorkommen. Dargestellt sind die Bereiche, die in dem Sequenzvergleich, durchgeführt mit Hilfe der NCBI Programme blastx und blastp, signifikante Ähnlichkeit zeigten (nach Karlin und Altschul, 1990 und 1993).

Die Berechnung des Hydropathie-Index des potentiellen Genproduktes von *intA* (nach Kyte und Doolittle, 1982) zeigte keine transmembranen oder Membran angelagerten Domänen. Die computergestützte Analyse sagt aus, daß IntA vermutlich im Cytoplasma der Zelle vorliegt.

Bei Sss handelt es sich um eine spezifische Rekombinase-Integrase, die für *Pseudomonas fluorescens* WCS365 essentiell in der Phase der Invasion der Wurzelhaare von Kartoffelpflanzen ist, mit denen das Bodenbakterium in einer symbiotischen Beziehung steht (Dekkers *et al.*, 1998). Weitere Untersuchungen ergaben, daß *intA* für die Ausbildung einer effektiven Symbiose mit *Glycine max* essentiell ist, die Ergebnisse sind in 3.5. dargestellt.

Das Hybridisierungsergebnis konnte in den Kontext der anderen durchgeführten Analysen eingeordnet werden und zeigte den relativen Genort des untersuchten DNA-Bereiches zu anderen bekannten Genen im Genom von *B. japonicum* 110 an (Abb.26).



B) Der symbioserelevante ORF *exoP*.

Die DNA-Region der *TnphoA*-Insertion im Genom von *B. japonicum* 2-10 ist demnach deutlich von dem als "symbiotische Region" bezeichneten DNA-Bereich entfernt, in dem ein großer Teil der *nol*, *nod* und *fix* Gene lokalisiert ist.

Aber auch andere Gene, die für die Ausbildung einer effektiven Symbiose mit *Glycine max* essentiell sind, konnten weit außerhalb der "symbiotischen Region" im Genom *B. japonicum* 110*spc4* von lokalisiert werden, wie beispielsweise der Exo Gen Cluster um *exoP* (Abb.26B).

3.5. *intA* ist essentiell für eine effektive Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow

Aufgrund der von Dekkers und Mitarbeitern (Dekkers *et al.*, 1998; Dekkers *et al.*, 2000) publizierten Daten, die die Relevanz des Integrase Gens *sss* von *Pseudomonas fluorescens* WCS365 bei der Infektion der Wurzelhaare von Kartoffel- und Tomatenpflanzen belegten, wurde der ORF *intA* von *B. japonicum* 110*spc4* auf seine Bedeutung für die Ausbildung der Endosymbiose mit *Glycine max* hin untersucht.

3.5.1. Konstruktion definierter Mutationen in *intA* durch VIM

Interne DNA-Fragmente von *intA* wurden mittels Restriktionsendonukleasen aus dem Hybridplasmid pB8.5 geschnitten, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Agarosegel isoliert.

Das resultierende 371 bp lange *HindIII*-*EcoRI* Fragment (bp 1132-1502 der in 3.4.4. angegeben DNA-Sequenz) und das 520 bp lange *EcoRI*-*EcoRV* Fragment (bp 1497-2016 der in 3.4.4. angegeben DNA-Sequenz) wurden entsprechend in den mobilisierbaren Vektor pNVDEmob kloniert.

Die so konstruierten Hybridplasmide pHE und pEV wurden zur Vektointegrationsmutagenese von *B. japonicum* 110*spc4* eingesetzt (Abb.27).

Die definierte Mutation im Genom der resultierenden Mutanten *B. japonicum* HE-1 und *B. japonicum* EV-3 wurde durch Southern Blotting kontrolliert und bestätigt.

Es sollte nicht unerwähnt bleiben, daß es bei der Expression von *intA* in den Vektorintegrationsmutanten noch zu einer Expression eines Anteils der Vektor-DNA kommen kann, bis die Translationsmaschinerie das nächste Stoppcodon erreicht. Bei *B. japonicum* HE können 20 weitere AS, in *B. japonicum* EV 15 AS nachträglich an das

verkürzte IntA gehängt werden. In beiden Fällen haben diese zusätzlichen Oligopeptide keine Ähnlichkeit mit der AS-Sequenz von IntA, schwächen also die Auswirkungen der Mutation keinesfalls ab, eine Verstärkung kann allerdings aufgrund sterischer Faktoren nicht ausgeschlossen werden

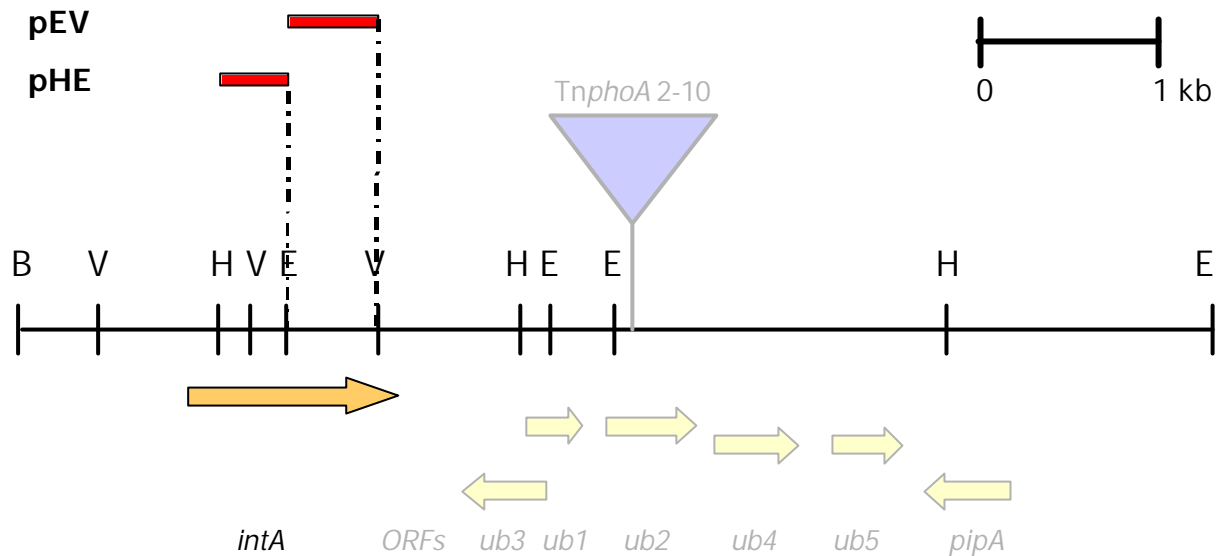


Abb.27: Graphische Darstellung der mutierten DNA-Region von *B. japonicum* 110spc4. Die ORFs sind durch Pfeile symbolisiert (die Umgebung von *intA* ist angedeutet, um eine Orientierung zu bieten). Die Hybridplasmide pHE und pEV wurden durch einfache Rekombination in das Genom von *B. japonicum* 110spc4 integriert.

Die Balken symbolisieren die rekombinierenden DNA-Fragmente. Die gestrichelten Linien markieren den jeweiligen Insertions-Ort des Vektors.

3.5.2. Die Phänotypen der Pflanzen in der Symbiose

Wenn die Mutanten *B. japonicum* HE-1 und *B. japonicum* EV-3 im Pflanzentest mit *Glycine max* bv. Maple Arrow eingesetzt wurden, führten sie zu unterschiedlich stark ausgeprägten Einschränkungen in der Pflanzenentwicklung, verglichen mit der Symbiose von *B. japonicum* 110spc4 mit *Glycine max* bv. Maple Arrow. Die Abb.28 zeigt die oberirdischen Pflanzenteile von *Glycine max* bv. Maple Arrow 28 bzw. 35 dpi mit den verschiedenen Stämmen von *Bradyrhizobium japonicum*. *B. japonicum* HE-1 verursachte deutliche Chlorosen der Blätter. Auch in der Symbiose mit *B. japonicum* EV-3 konnte *Glycine max* bv. Maple Arrow nicht optimal wachsen, die Chlorosen waren allerdings nur sehr schwach und das Pflanzenwachstum 35 dpi entsprach annähernd dem der mit dem WT inokulierten Pflanzen.



Abb.28: Oberirdische Teile von *Glycine max* bv. Maple Arrow 28 dpi mit *B. japonicum* 110spc4 (110) bzw. *B. japonicum* HE-1 (pHE-1) und *B. japonicum* EV-3 (pEV-3). Die mit den Mutanten inokulierten Pflanzen trugen chlorotische Blätter, während die mit *B. japonicum* 110spc4 inokulierten Sojabohnen keine Beeinträchtigung in der Entwicklung aufwiesen.

Auch an den unterirdischen Pflanzenteilen konnten 21 dpi Unterschiede in der Ausbildung der Symbiose identifiziert werden. Das Wurzelsystem der Pflanzen, die mit *B. japonicum* HE-1 infiziert waren, war wesentlich weniger verzweigt (Abb.29) und die in der Symbiose mit den unterschiedlichen *B. japonicum* Mutanten ausgebildeten Wurzelknöllchen waren in ihrer Zahl und Größe unterschiedlich stark reduziert (Tab.03).

<i>Glycine max</i> bv. Maple Arrow im Pflanzentest 21 dpi	Knöllchenzahl pro Pflanze	Knöllchengröße
<i>B. japonicum</i> 110spc4	31 ± 13	2,0 mm ± 1,0
<i>B. japonicum</i> HE-1	19 ± 10	1,0 mm ± 0,5
<i>B. japonicum</i> EV-3	27 ± 16	2,0 mm ± 1,0

Tab.03: Dargestellt sind Größe und Anzahl der Knöllchen pro Pflanze, gebildet von *Glycine max* bv. Maple Arrow in der Symbiose *B. japonicum* 110spc4, *B. japonicum* HE-1 und *B. japonicum* EV-3 21 dpi.

Es ist der jeweilige Durchschnittswert aus mindestens drei Versuchen angegeben, sowie die entsprechende Standardabweichung der Knöllchenzahl.

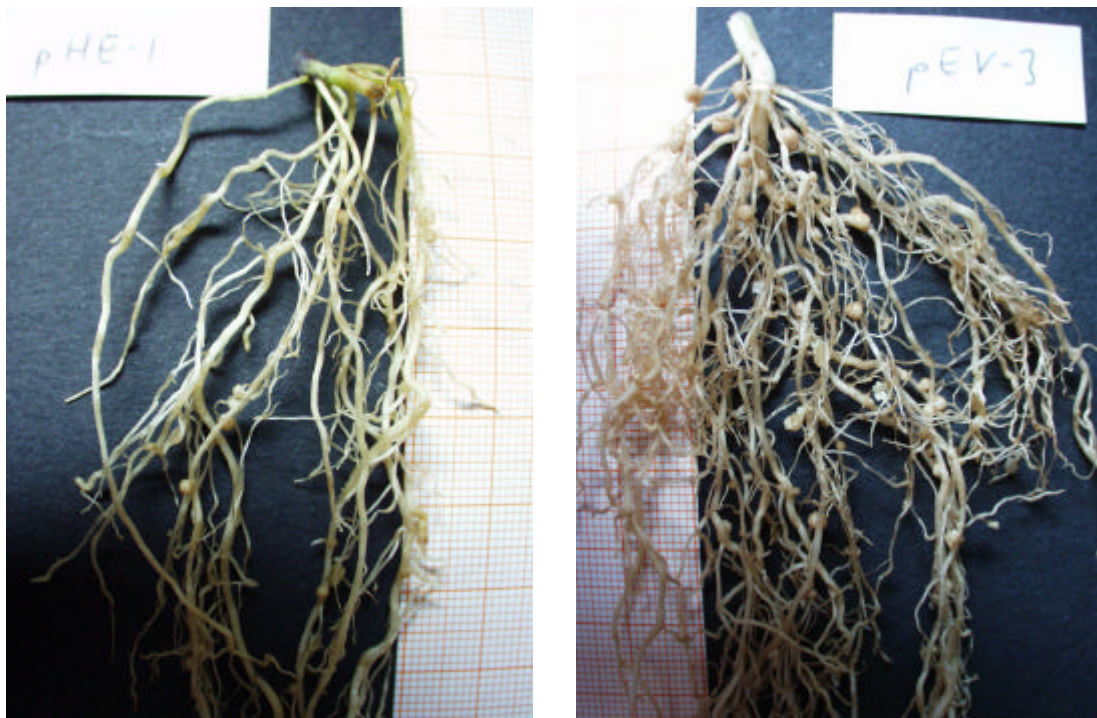


Abb.29: Unterirdische Teile von *Glycine max* bv. Maple Arrow 21 dpi mit *B. japonicum* HE-1 (pHE-1) bzw. *B. japonicum* EV-3 (pEV-3). Die mit *B. japonicum* HE-1 inokulierten Pflanzen hatten ein weniger stark verzweigtes Wurzelsystem als diejenigen, die mit dem *B. japonicum* EV-3 inokuliert waren. Darüberhinaus war die durch die Mutante *B. japonicum* HE-1 hervorgerufene Nodulation der Pflanze erheblich geringer als bei *B. japonicum* EV-3.

Auch diese Beobachtungen zeigten, daß die Unterbrechung von IntA bei AS 184 (von 388) in *B. japonicum* HE-1 deutlich stärkere Einschränkungen in der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow bewirkte, als dies bei einer Unterbrechung von IntA bei AS 356 (von 388) in *B. japonicum* EV-3 der Fall war.

3.5.3. Die N₂-Fixierungsleistung der Knöllchen

Mit beiden bakteriellen Partnern war *Glycine max* bv. Maple Arrow nicht in der Lage, eine symbiotische Beziehung einzugehen, die in ihrer Effizienz der mit dem WT entsprach.

Die in der Symbiose von *Glycine max* bv. Maple Arrow mit *B. japonicum* HE-1 gebildeten Knöllchen waren Fix⁻. In der Symbiose mit *B. japonicum* EV-3 waren die von *Glycine max* bv. Maple Arrow gebildeten Knöllchen immerhin zu einer Fixierungsleistung von durchschnittlich 1,2 nmol Ethen·mg KFG⁻¹·h⁻¹ in der Lage, was etwa 7 % des Wertes entspricht, der in der Symbiose mit dem WT *B. japonicum* 110*spc4* erreicht wurde. Der Vergleich der Fixierungs-Werte ist in Abb.30 dargestellt.

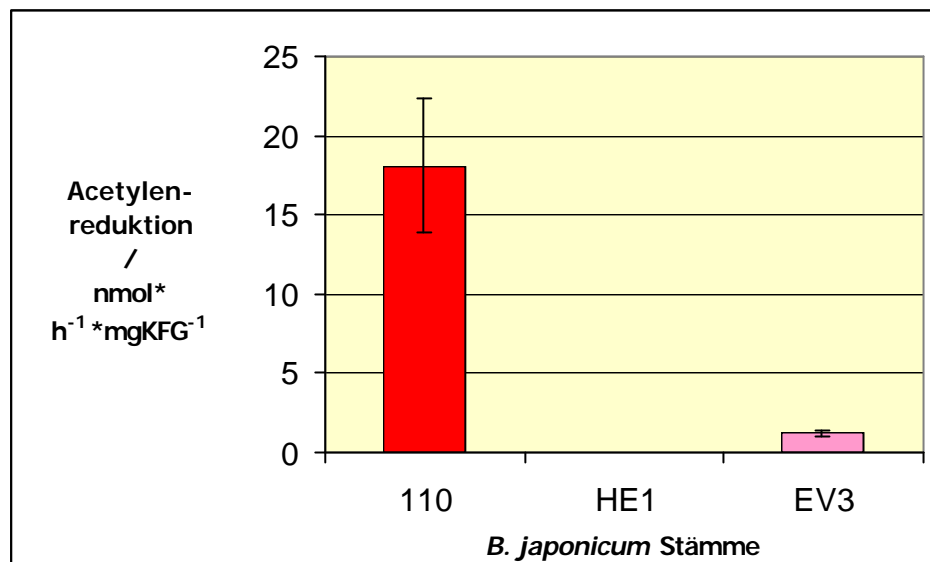


Abb.30: Graphische Darstellung der Fixierungsleistung der Knöllchen von *Glycine max* bv. Maple Arrow, 21 dpi mit verschiedenen Stämmen von *B. japonicum*.

Die Stickstoff-Fixierungsleistung ist in nmol Ethen·mg KFG⁻¹·h⁻¹ angegeben. Die Standardabweichung wird durch senkrechte Striche dargestellt.

3.5.4. Licht- und elektronenmikroskopische Analyse der Knöllchen

Bereits in der lichtmikroskopischen Analyse konnte erkannt werden, daß in den Knöllchen aus der Symbiose von *Glycine max* bv. Maple Arrow mit *B. japonicum* HE-1 sowohl große Bereiche nicht-infizierter Zellen als auch Felder infizierter Zellen im inneren Gewebe vorlagen. In den Knöllchen, die aus der Symbiose von *Glycine max* bv. Maple Arrow mit *B. japonicum* EV-3 resultierten, war die Infizierung dagegen gleichmäßiger. Es waren auch hier nicht-infizierte Zellen zu sehen aber keine Ausbildung größerer nicht-infizierter Gewebebereiche.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Abb.31 und Abb.32) bestätigten diese Beobachtungen und zeigten darüberhinaus auf, daß beide *B. japonicum* Mutanten in der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow eingeschränkt waren. Die negativen Auswirkungen der Mutation in *B. japonicum* HE-1 auf die Ausbildung dieser Symbiose waren aber deutlich stärker als die der Mutation in *B. japonicum* EV-3.

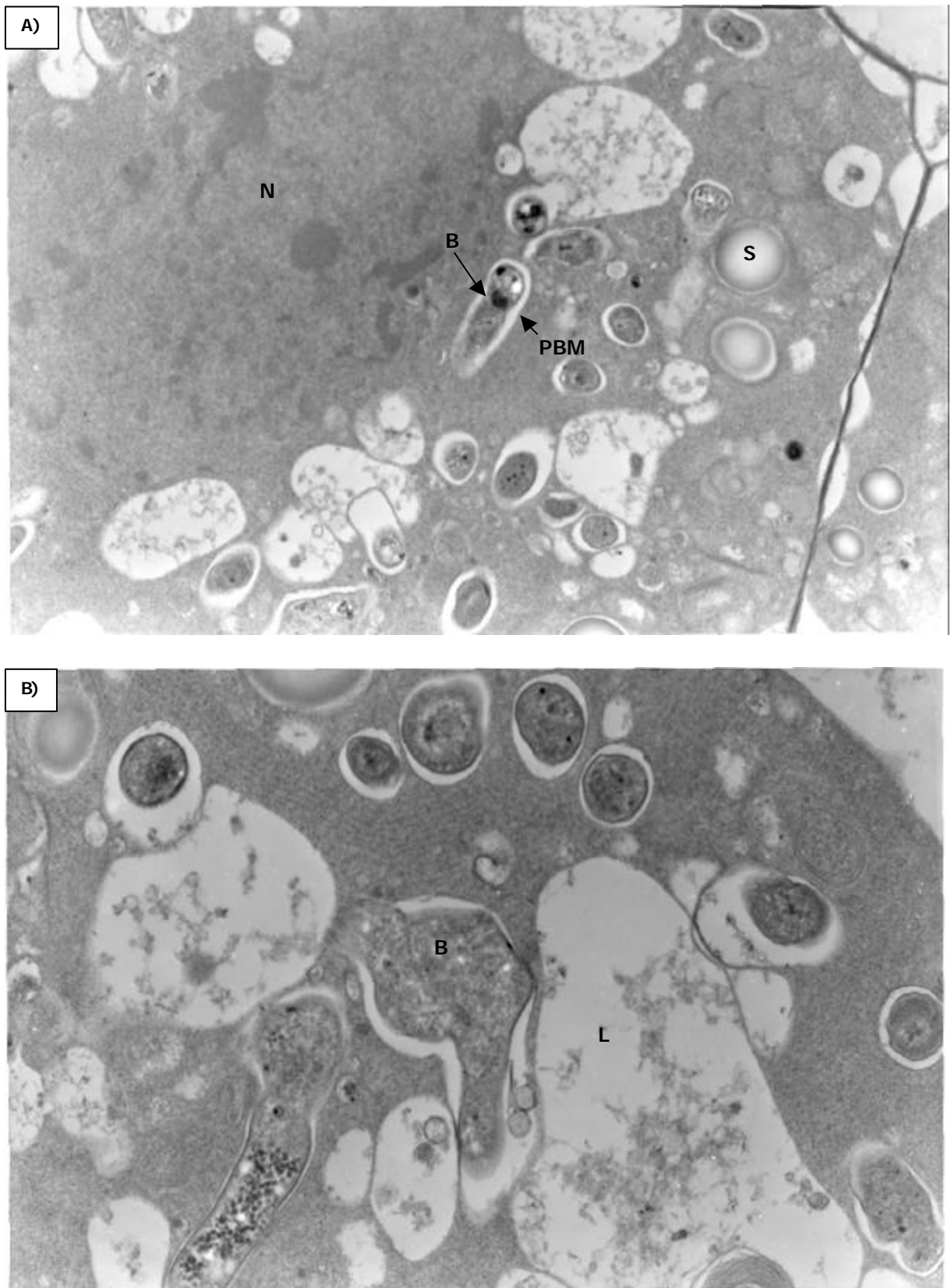


Abb.31: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten des inneren Gewebes von Wurzelknöllchen aus der Symbiose von *B. japonicum* HE-1 mit *Glycine max* bv. Maple Arrow 21dpi.

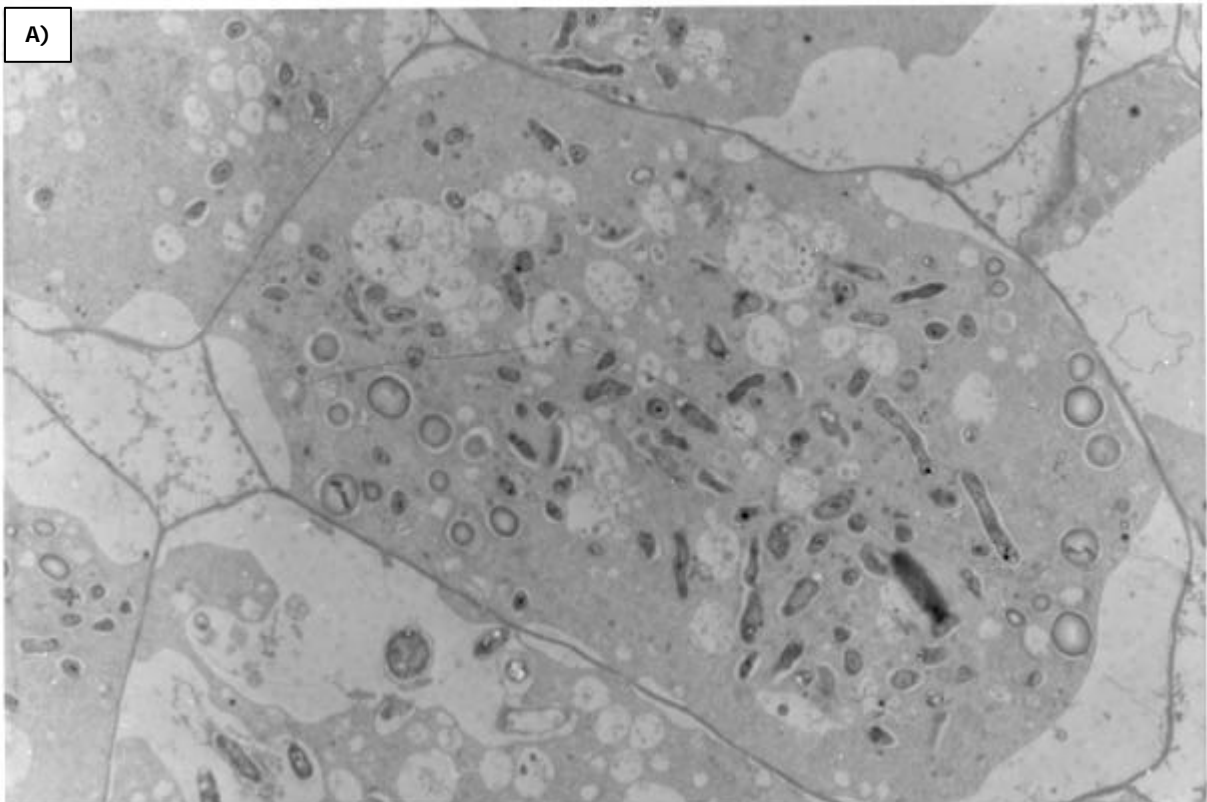
In den Aufnahmen wurden selektiv beispielhafte Strukturen markiert: potentielle Lysosomen (L), den Zellkern (N), Stärkekörner (S), die Peribakteroiden Membran (PBM) und Bakterioide (B).

Vergrößerung: 11400x (A); 18930x (B)

Die Pflanzenzellen der infizierten Bereiche in den Wurzelknöllchen aus der Symbiose von *Glycine max* bv. Maple Arrow mit *B. japonicum* HE-1 enthielten nur eine geringe Anzahl von Symbiosomen. Die meisten dieser Symbiosomen entsprachen bereits nicht mehr dem Phänotyp des WT; so war die PBM in vielen Fällen weit vom Bakteroid abgelöst (Abb.31B) und es konnten stark deformierte Bakterioide beobachtet werden (Abb.31A und B).

Die identifizierten Infektionsschläuche enthielten Bakterien, aber auch diese erschienen bereits deformiert und nicht gleichmäßig geformt, wie dies beim WT zu beobachten war.

Die Zellen enthielten Stärkekörner und eine große Anzahl relativ kleiner Vakuolen, die meist mit elektronendichtem Material gefüllt waren. Die stark deformierten Bakterioide in Abb.31C schienen in Auflösung zu sein, was die Vermutung unterstützte, daß es sich bei einem Großteil der Vakuolen um Lysosomen handelte, in denen die Bakterioide von den Pflanzenzellen verdaut wurden.



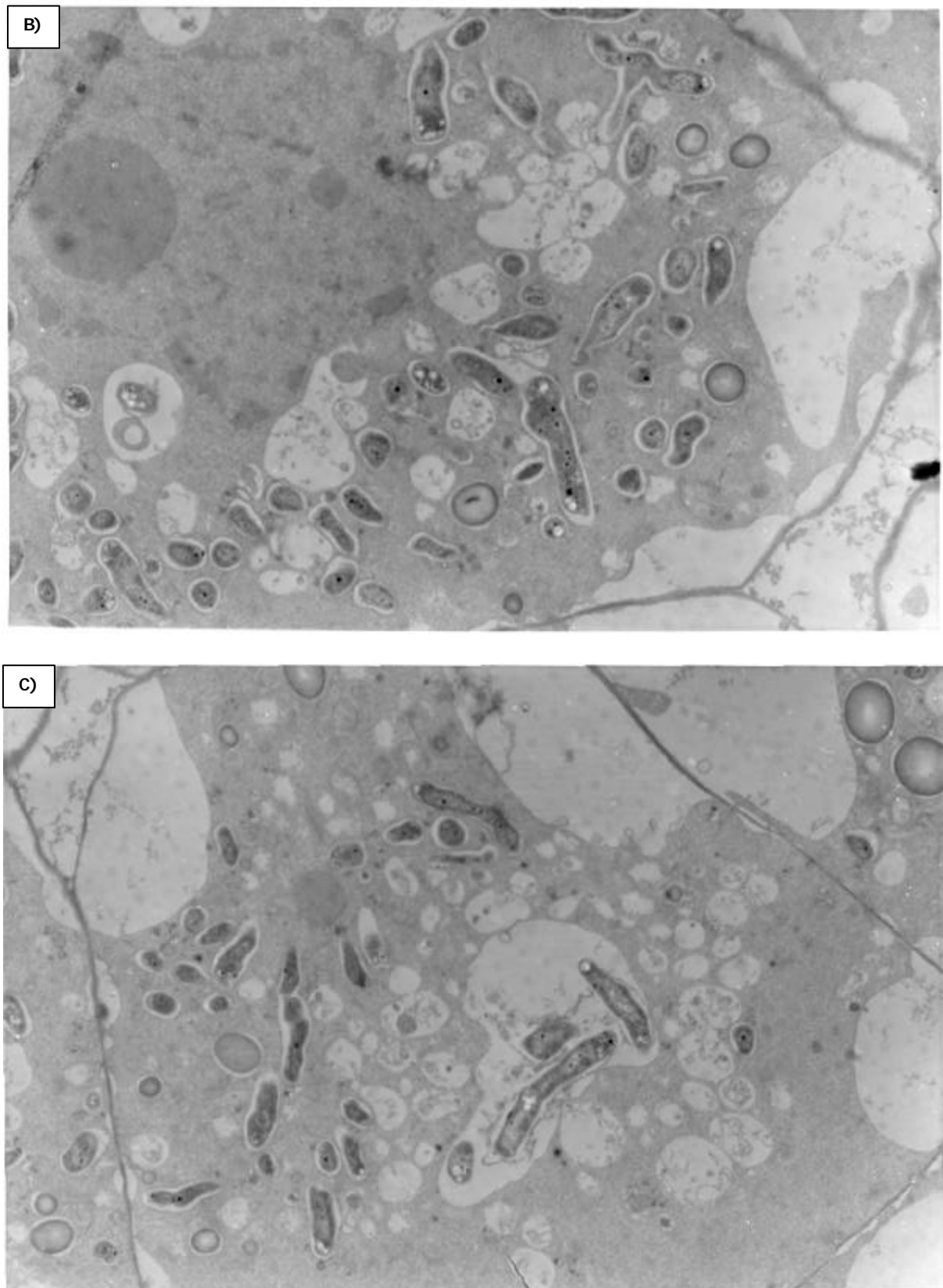


Abb.32: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten des inneren Gewebes von Wurzelknöllchen aus der Symbiose von *B. japonicum* EV-3 mit *Glycine max* bv. Maple Arrow 21dpi. Vergrößerung: 5410x (A); 8310x (B); 6960x (C)

Die infizierten Zellen im zentralen Gewebe der Wurzelknöllchen von *Glycine max* bv. Maple Arrow in Symbiose mit *B. japonicum* EV-3 enthielten eine verringerte Anzahl von Symbiosomen im Vergleich zum WT, waren aber deutlich stärker infiziert als es in der Symbiose mit *B. japonicum* HE-1 der Fall war. Ein Großteil der Symbiosomen erschien unbeeinflusst, nur einige zeigten Deformationen der Bakterioide (Abb.32B) und vergrößerte PBM (Abb.32A und C).

Wie bereits in der Symbiose mit *B. japonicum* HE-1 beobachtet, enthielten auch die infizierten Pflanzenzellen dieser Wurzelknöllchen eine größere Anzahl von Stärkekörnern als dies beim WT der Fall war.

Die infizierten Zellen enthielten kleine Vakuolen, angefüllt mit elektronendichtem Material, die auch in dieser Symbiose Lysosomen zu sein schienen, in denen Bakterioide abgebaut wurden, was durch die Beobachtungen in Abb.32A unterstützt wurde.

3.6. Vektorintegrationsmutagenese in *B. japonicum* 110spc4 und Komplementationsversuche in *B. japonicum* 2-10

Um die Relevanz der verschiedenen ORFs für die Symbiose von *B. japonicum* 110spc4 mit *Glycine max* zu belegen, wurden definierte Mutanten konstruiert und analysiert. Dies diente außerdem dazu, die Organisation der ORFs und die Operonstruktur der DNA-Region zu verstehen.

Darüberhinaus sollte der direkte Zusammenhang zwischen Phänotyp und Mutation von *B. japonicum* 2-10 durch genetische Komplementation bestätigt werden.

D.h. es wurden zwei verschiedene Strategien zur Analyse dieser DNA-Region verfolgt, einerseits die kontrollierte Mutagenese von *B. japonicum* 110spc4 und andererseits die Integration definierter WT-DNA-Fragmente in die Mutante *B. japonicum* 2-10 durch homologe Rekombination.

3.6.1. Konstruktion definierter Mutanten durch VIM und Komplementation

Mit Hilfe von Restriktion oder PCR wurden interne DNA-Fragmente aus *B. japonicum* 110spc4 gewonnen bzw. konstruiert, die für die anschließende Mutagenese von *B. japonicum* in mobilisierbare Vektoren kloniert wurden, die Zusammensetzung der Hybridplasmide ist in Tab.04 angegeben. Die graphische Darstellung der Insertionen folgt in Abb.33 und Abb.34.

Hybridplasmid	Vektor	Insert (Position in der DNA-Sequenz aus 3.4.4.)
pfr1ΔS	pK18mob	146 bp <i>SmaI-SalI</i> Fragment (bp 3017-3162)
p4JQ	pJQ200SK	318 bp <i>BamHI-NotI</i> Fragment (bp 3916-4233)
p5JQ	pJQ200SK	317 bp <i>BamHI-NotI</i> Fragment (bp 4550-4866)
pbvΔ	pJQ200SK	531 bp <i>SalI-BglII</i> Fragment (bp 3157-3687)
p911	pJQ200SK	2385 bp <i>XhoI-BamHI</i> Fragment (bp 1983-4367)
p1011	pJQ200SK	3068 bp <i>XhoI-BamHI</i> Fragment (bp 1983-5050)

Tab.04: Die DNA-Organisation in den für VIM und Komplementierung eingesetzten Hybridplasmiden.

Die Angaben zu dem jeweiligen Insert beziehen sich nur auf die DNA-Sequenz, die der im Genom von *B. japonicum* 110spc4 entspricht, durch konstruierte Primer wurde in einigen Fällen das DNA-Fragment um Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen verlängert. Die graphische Darstellung der Insertionen erfolgte in Abb.33 und Abb.34.

Die Ziel-Region des Genoms der zwei zu mutierenden Bakterienstämme ist in den folgenden Abbildungen dargestellt. So zeigt die Abb.33 einerseits die verschiedenen Mutanten von *B. japonicum* 110spc4, die durch Vektorintegrationsmutagenese (VIM) konstruiert wurden, und Abb.34 stellt die Mutanten dar, die zur Komplementierung der *TnphoA*-Insertion in *B. japonicum* 2-10 konstruiert wurden. Bei den Komplementationsversuchen wurden einerseits die Mutanten *B. japonicum* 2-10-bvΔ11 und *B. japonicum* 2-10-1011-u, bei denen die Rekombination upstream der *TnphoA*-Insertion stattgefunden hatte, und andererseits die Mutante *B. japonicum* 2-10-1011-d, bei der die Rekombination downstream der *TnphoA*-Insertion stattgefunden hatte, für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

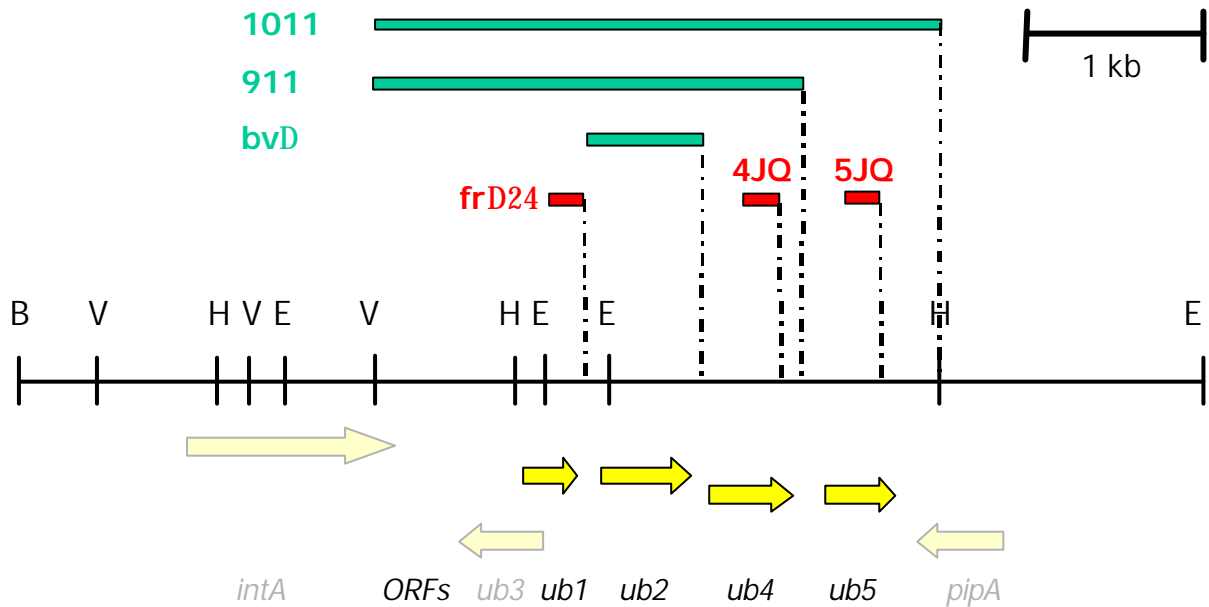


Abb.33: Graphische Darstellung der mutierten genetischen Region aus dem Genom von *B. japonicum* 110spc4. Die ORFs sind durch Pfeile symbolisiert. Die Hybridplasmide wurden durch einfache Rekombination in das Genom von *B. japonicum* 110spc4 integriert, die Bezeichnungen betreffen die resultierenden Klone.

Die Balken symbolisieren die rekombinierenden DNA-Fragmente. Die gestrichelten Linien markieren den jeweiligen Insertions-Ort des Vektors. Rot markiert sind die Fragmente, die eine VIM bewirken, grün diejenigen, die keinen ORF unterbrechen.

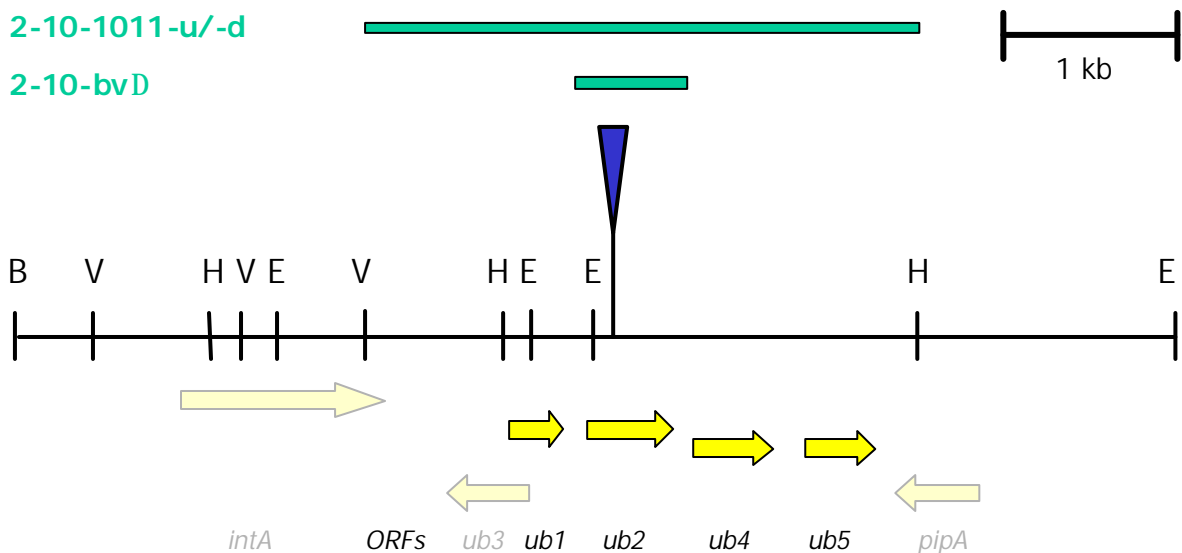


Abb.34: Graphische Darstellung der mutierten genetischen Region aus dem Genom von *B. japonicum* 2-10. Die ORFs sind durch Pfeile symbolisiert.

Die Hybridplasmide wurden durch einfache Rekombination in das Genom von *B. japonicum* 2-10 integriert, die Bezeichnungen betreffen die resultierenden Klone. Die Balken symbolisieren die integrierten DNA-Fragmente. Der Ort der TnphoA-Insertion ist durch ein blaues Dreieck markiert.

3.6.2. Die Phänotypen der Pflanzen in der Symbiose

In der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow zeigten sich unterschiedlich starke negative Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum durch die *B. japonicum* Mutanten, verglichen mit dem WT *B. japonicum* 110*spc4* (Abb.35).

Bei den Komplementationsversuchen in *B. japonicum* 2-10-bv Δ und *B. japonicum* 210-1011-u sowie 210-1011-d zeigte sich keine Verbesserung des Pflanzenwachstums im Vergleich mit der Ausgangsmutante *B. japonicum* 2-10. Es war auch kein Unterschied erkennbar zwischen den Mutanten *B. japonicum* 2-10-1011-u, bei der die Rekombination upstream der *TnphoA*-Insertion stattgefunden hatte, und *B. japonicum* 2-10-1011-d, bei der die Rekombination downstream der *TnphoA*-Insertion stattgefunden hatte.

Die Mutation in *B. japonicum* fr Δ 24 verursachte Chlorosen bei *Glycine max* bv. Maple Arrow, die denen in der Symbiose mit *B. japonicum* 2-10 glichen.

B. japonicum 4JQ bewirkte die stärksten Chlorosen bei *Glycine max* bv. Maple Arrow 28 dpi, der Phänotyp der oberirdischen Pflanzenteile entsprach Pflanzen, die steril angezogen wurden (Abb.02).

In der Symbiose mit *B. japonicum* 5JQ, mutiert in ORF *ub5*, waren die negativen Auswirkungen auf den pflanzlichen Phänotyp nicht ganz so stark ausgeprägt wie bei den beiden anderen Mutanten.

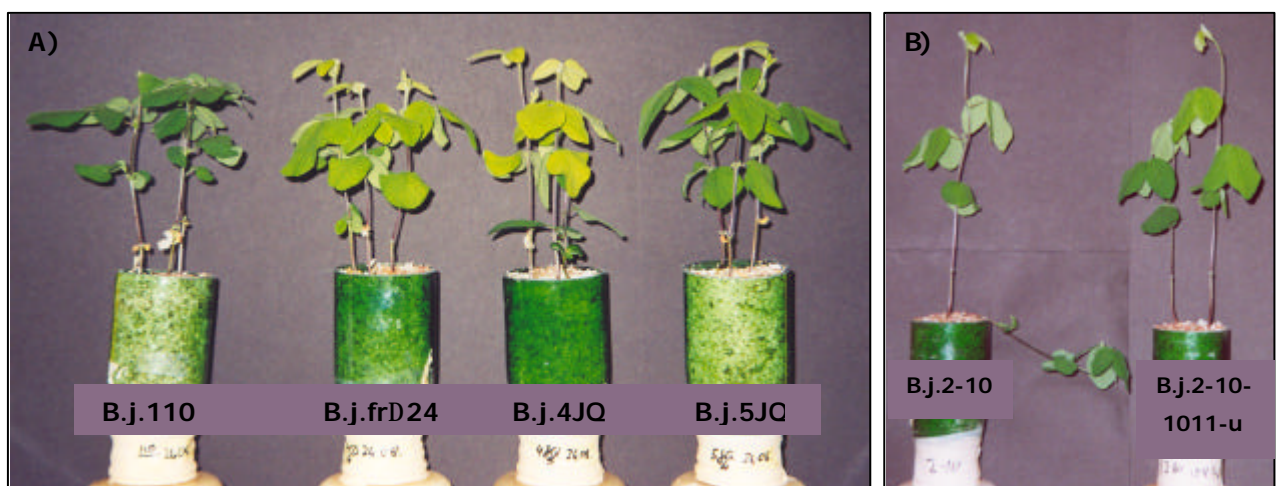


Abb.35: Oberirdische Teile von *Glycine max* bv. Maple Arrow 28 dpi mit verschiedenen *B. japonicum* Stämmen. Die mit den Mutanten inokulierten Pflanzen trugen unterschiedlich stark chlorotische Blätter, während die mit *B. japonicum* 110*spc4* inokulierten Sojabohnen keine Beeinträchtigung im Wachstum aufwiesen.

A) Vergleich der VIM-Klone mit dem WT.

B) Vergleich der Mutante *B. japonicum* 2-10-1011-u mit der Ausgangsmutante *B. japonicum* 2-10.

Auch am Wurzelsystem der Pflanzen ließen sich Unterschiede ausmachen.

21 dpi war anhand der Verzweigung der Wurzeln und den an ihnen produzierten Knöllchen zu erkennen, daß keine der untersuchten Mutanten zur Ausbildung einer effektiven Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow befähigt war.

Die Komplementations-Mutanten *B. japonicum* 2-10-bv Δ 11, *B. japonicum* 210-1011-u und 210-1011-d zeigten auch in Bezug auf das Wurzelwachstum und die Nodulierung keine Veränderung gegenüber *B. japonicum* 2-10.

Die VIM-Klone bewiesen, daß die untersuchte DNA-Region einen Einfluß auf die Ausbildung der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow hatte. Die Nodulierung war durch die VIM verändert (Tab.05).

<i>Glycine max</i> bv. Maple Arrow im Pflanzentest 21 dpi	Knöllchenzahl pro Pflanze	Knöllchengröße
<i>B. japonicum</i> 110spc4	31 \pm 13	2,0 mm \pm 1,0
<i>B. japonicum</i> fr Δ -24	38 \pm 16	1,0 mm \pm 0,5
<i>B. japonicum</i> bv Δ	47 \pm 7	2,0 mm \pm 1,0
<i>B. japonicum</i> 4JQ	28 \pm 13	1,5 mm \pm 0,5
<i>B. japonicum</i> 5JQ	68 \pm 23	2,0 mm \pm 1,0
<i>B. japonicum</i> 911	31 \pm 18	2,0 mm \pm 1,0
<i>B. japonicum</i> 1011	35 \pm 8	2,0 mm \pm 1,0

Tab.05: Dargestellt sind Größe und Anzahl der Knöllchen pro Pflanze, gebildet von *Glycine max* bv. Maple Arrow in der Symbiose *B. japonicum* 110spc4 bzw. verschiedenen *B. japonicum* Mutanten 21 dpi.

Es ist der jeweilige Durchschnittswert aus mindestens drei Versuchen angegeben, sowie die entsprechende Standardabweichung der Knöllchenzahl.

3.6.3. Die N₂-Fixierungsleistung der Knöllchen

Keine der konstruierten Mutanten war in der Lage, mit *Glycine max* bv. Maple Arrow eine symbiotische Beziehung auszubilden, die in ihrer Effizienz der mit dem WT entsprach.

Die Ergebnisse der Acetylenreduktionstests sind in Abb.36 dargestellt und belegen die unterschiedlich starke Beeinträchtigung der Effizienz der symbiotischen Beziehungen.

Die auf der *TnphoA*-Mutante *B. japonicum* 2-10 basierenden Stämme waren allesamt Fix^- . Bei den VIM-Klonen, die auf dem WT beruhten, konnten *B. japonicum* *bvΔ* und *B. japonicum* 5JQ in der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow Stickstoff fixierende Wurzelknöllchen hervorrufen, die Mutanten *B. japonicum* *frΔ24* und *B. japonicum* *bvΔ* bewirkten einen Fix^- Phänotyp.

Auch die Mutanten *B. japonicum* 911 und 1011 waren zwar zur symbiotischen Stickstoff-Fixierung befähigt, erreichten aber in ihrer Effektivität nicht die Werte des WT.

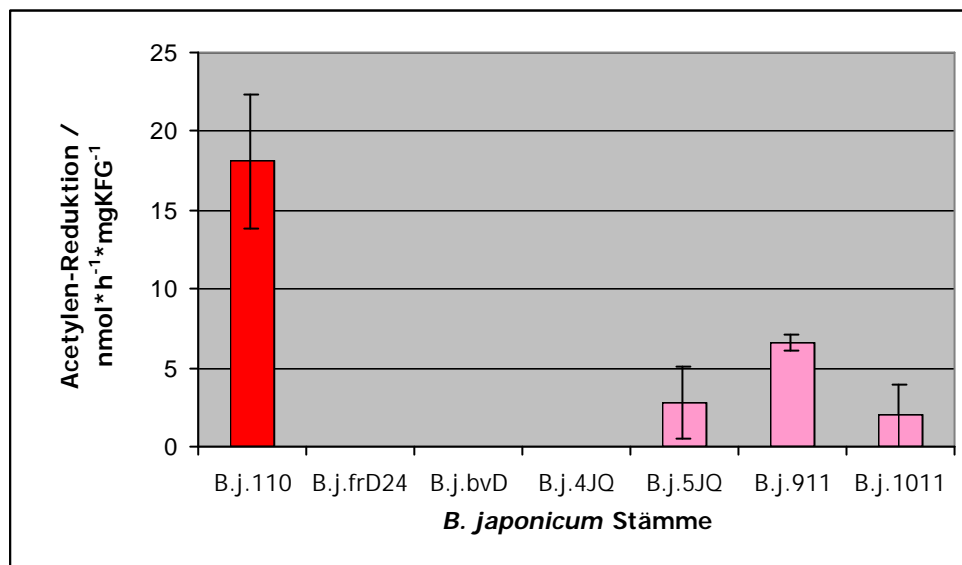


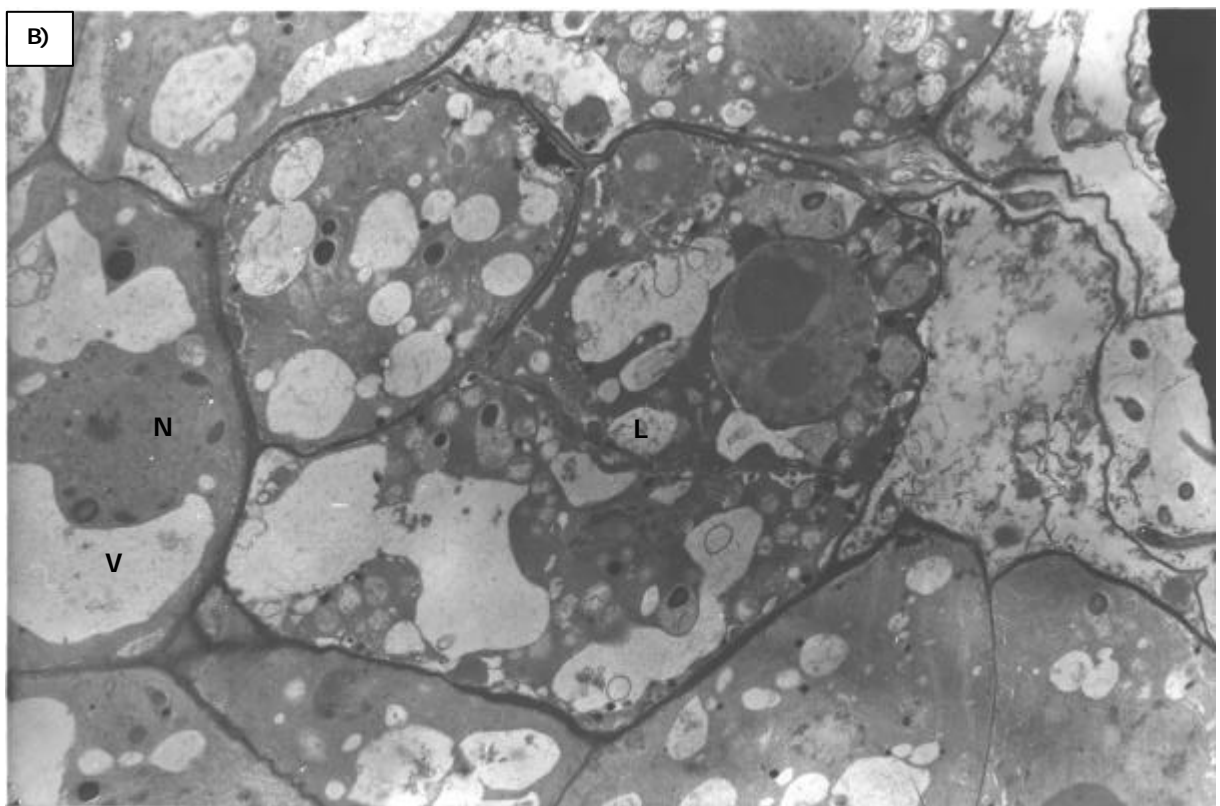
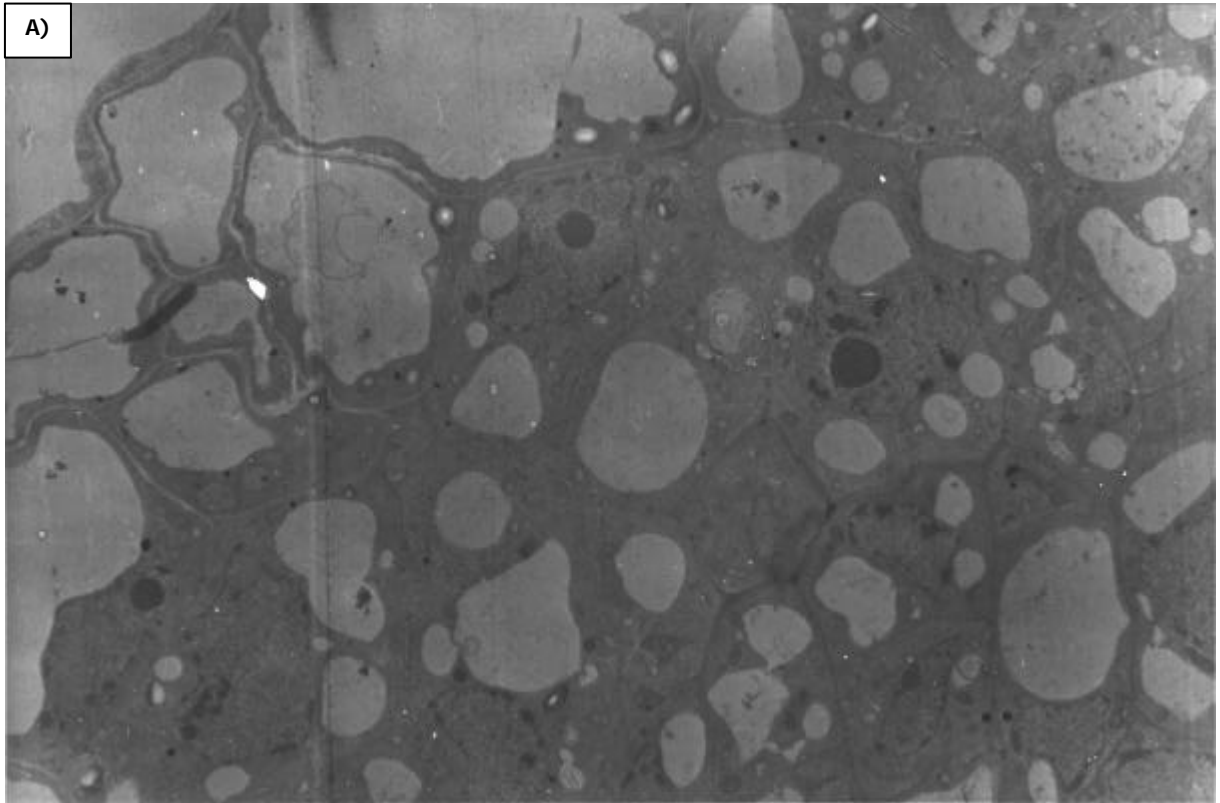
Abb.36: Graphische Darstellung der Fixierungsleistung der Knöllchen von *Glycine max* bv. Maple Arrow, 21 dpi mit verschiedenen Stämmen von *B. japonicum*.

Die durchschnittliche Stickstoff-Fixierungsleistung ist in $\text{nmol Ethen} \cdot \text{mg KFG}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ angegeben.

3.6.4. Licht- und elektronenmikroskopische Analyse der Knöllchen

Die mikroskopische Analyse der Wurzelknöllchen, die aus der Symbiose von *Glycine max* bv. Maple Arrow mit den verschiedenen *B. japonicum* Stämmen resultierten, zeigte die unterschiedlich starken Auswirkungen der Mutationen auf die frühen symbiotischen Vorgänge auf.

Mit der Bezeichnung WT wird in diesem Abschnitt auch die Symbiose von *Glycine max* bv. Maple Arrow mit dem WT *B. japonicum* 110*spc4* - sowie die daraus resultierenden Strukturen - angesprochen.



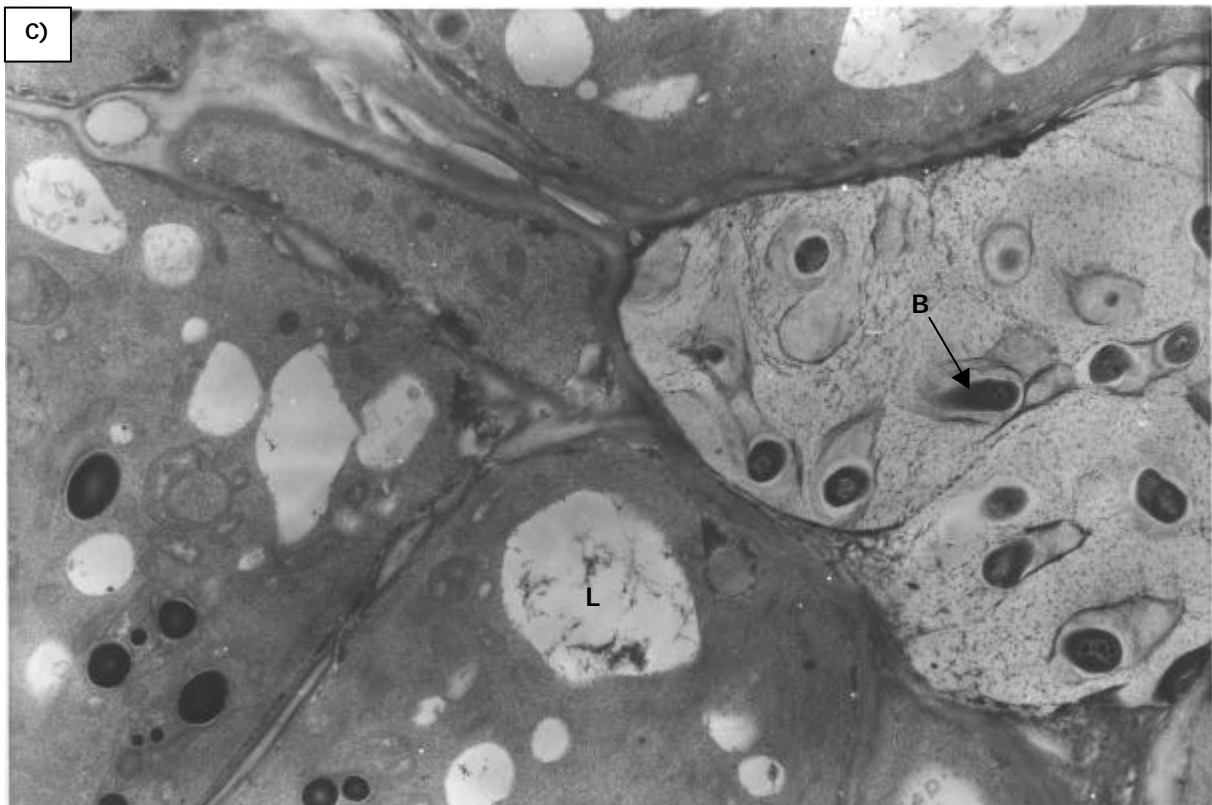


Abb.37: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten des inneren Gewebes von Wurzelknöllchen aus der Symbiose von *B. japonicum* 2-10-bv Δ mit *Glycine max* bv. Maple Arrow 21dpi. In den Aufnahmen wurden beispielhafte Strukturen markiert: Vakuolen (V), potentielle Lysosomen (L), den Zellkern (N) und Bakterioide (B). Vergrößerung: 4250x (A); 5410x (B); 8310x (C)

Der Klon *B. japonicum* 2-10-bv Δ resultierte aus der Integration des Plasmids pbv Δ in das Genom der Mutante *B. japonicum* 2-10. Die homologe Rekombination erfolgte upstream der TnphoA-Insertion und komplementierte damit den ORF *ub2*.

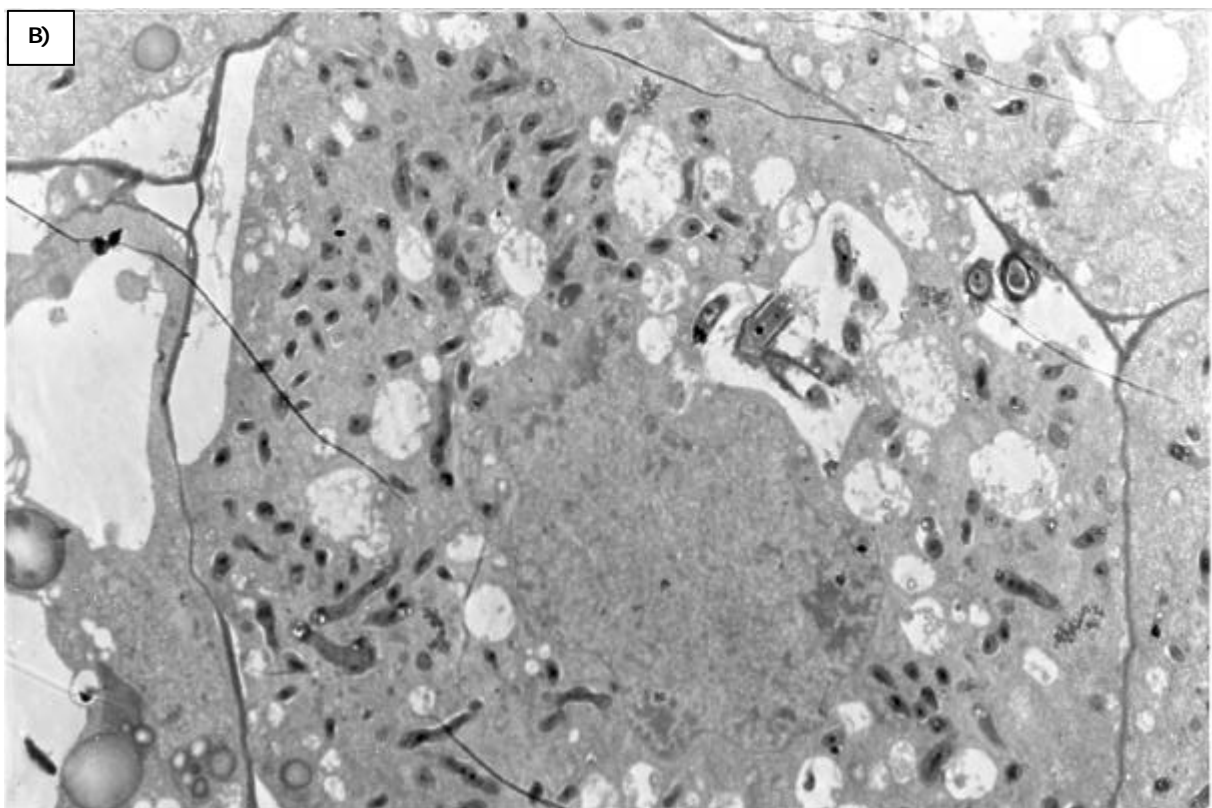
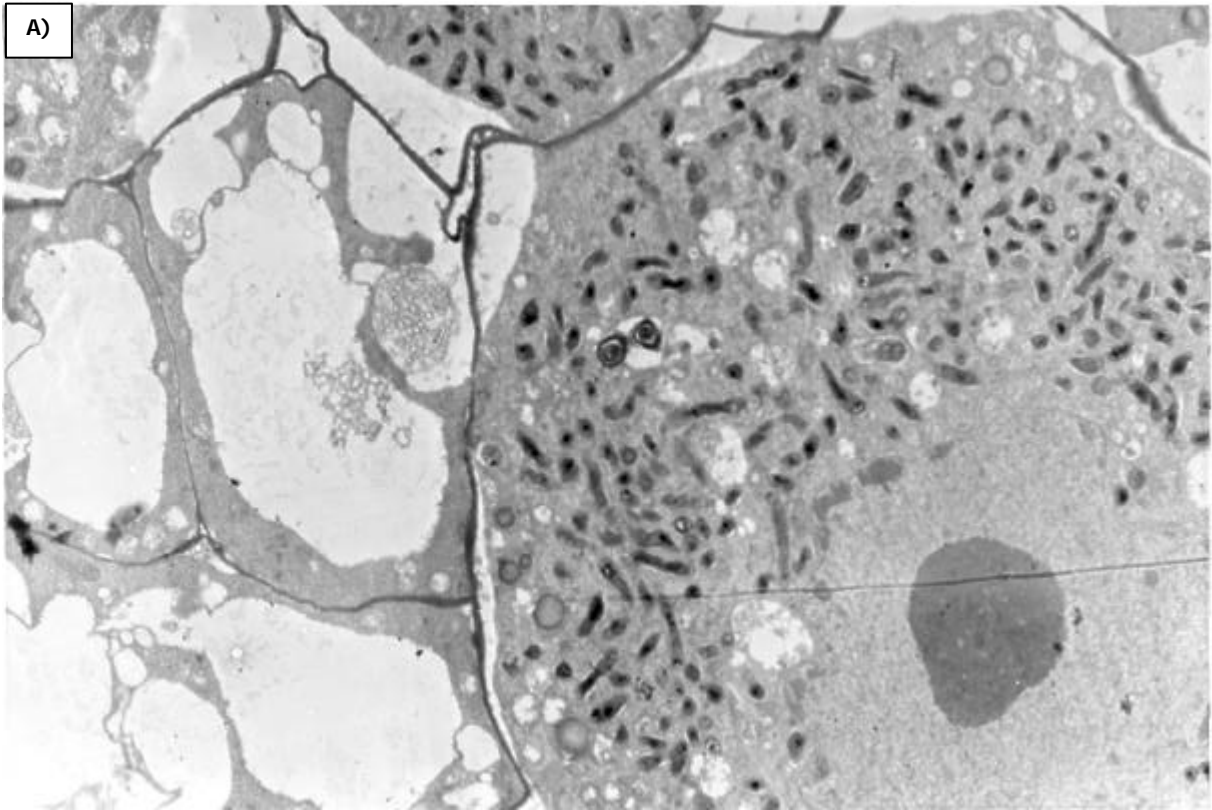
Dieser Klon zeigte auch in der ultrastrukturellen Analyse keine Verbesserung gegenüber der Ausgangsmutante *B. japonicum* 2-10. Die Integration des Plasmids pbv Δ , die den ORF *ub2* vervollständigte, veränderte den Genotyp aber augenscheinlich nicht den Phänotyp.

Die Zellen des inneren Gewebes der Wurzelknöllchen, resultierend aus der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow, sind nur sehr schwach infiziert. In den meisten Fällen enthielten sie überhaupt keine Symbiosomen.

Daß die Bakterien in die Knöllchen gelangten, konnte anhand von Infektionsschläuchen und Interzellularen (Abb.37C) gezeigt werden, in denen intakte Bakterien beobachtet wurden. Intrazellulär konnten dagegen keine unbeeinträchtigten Bakterioide gefunden werden.

Das Vakuom der Zellen des infizierten Gewebes war deutlich stärker ausgebildet, als dies beim WT der Fall war, und einige der Vakuolen waren mit elektronendichtem Material gefüllt, was auf eine Lyse der Bakterioide hindeutete.

Darüberhinaus waren in den Zellen größere Mengen von Stärkekörnern vorhanden.



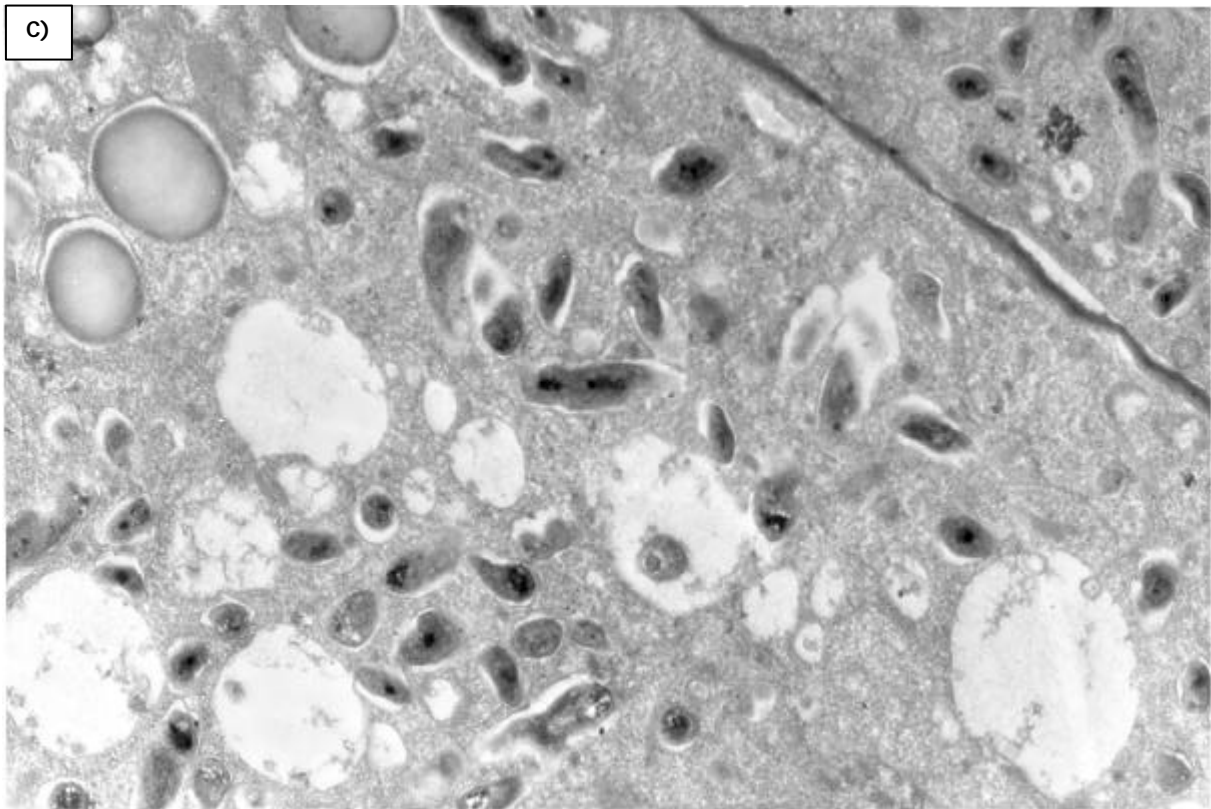


Abb.38: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten des inneren Gewebes von Wurzelknöllchen aus der Symbiose von *B. japonicum* 2-10-1011-u mit *Glycine max* bv. Maple Arrow 21dpi. Vergrößerung: 5410x (A); 5410x (B); 11400x (C)

Der Klon *B. japonicum* 2-10-1011-u resultierte aus der Integration des Plasmids p1011 in das Genom der Mutante *B. japonicum* 2-10. Die homologe Rekombination erfolgte upstream der *TnphoA*-Insertion und komplementierte damit den Bereich bis einschließlich ORF *ub5*.

Die Integration des Plasmids p1011 in das Genom von *B. japonicum* 2-10 bewirkte zwar makroskopisch keine Veränderungen in der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow, aber in der ultrastrukturellen Analyse zeigte sich eine deutliche Veränderung bei *B. japonicum* 2-10-1011-u im Vergleich zu der Ausgangsmutante *B. japonicum* 2-10.

Ein Großteil der Zellen des inneren Gewebes der Wurzelknöllchen war infiziert, wobei die Anzahl der Symbiosomen im Vergleich zum WT verringert war, aber im Vergleich zu *B. japonicum* 2-10 war die Infektionsrate deutlich erhöht.

Es fanden sich sowohl gleichmäßig geformte als auch einige deformierte Bakterioide. In den meisten Fällen umgab die PBM das entsprechende Bakteroid relativ eng, wie dies auch beim WT der Fall war.

In den infizierten Zellen waren zusätzlich kleine Vakuolen, gefüllt mit elektronendichtem Material, zu erkennen. In Abb.38B konnte ein Lysosom dokumentiert werden, in dem die Zersetzung mehrerer Bakterioide im Gang war.

In den infizierten wie auch in den nicht-infizierten Zellen waren Stärkekörner vorhanden.

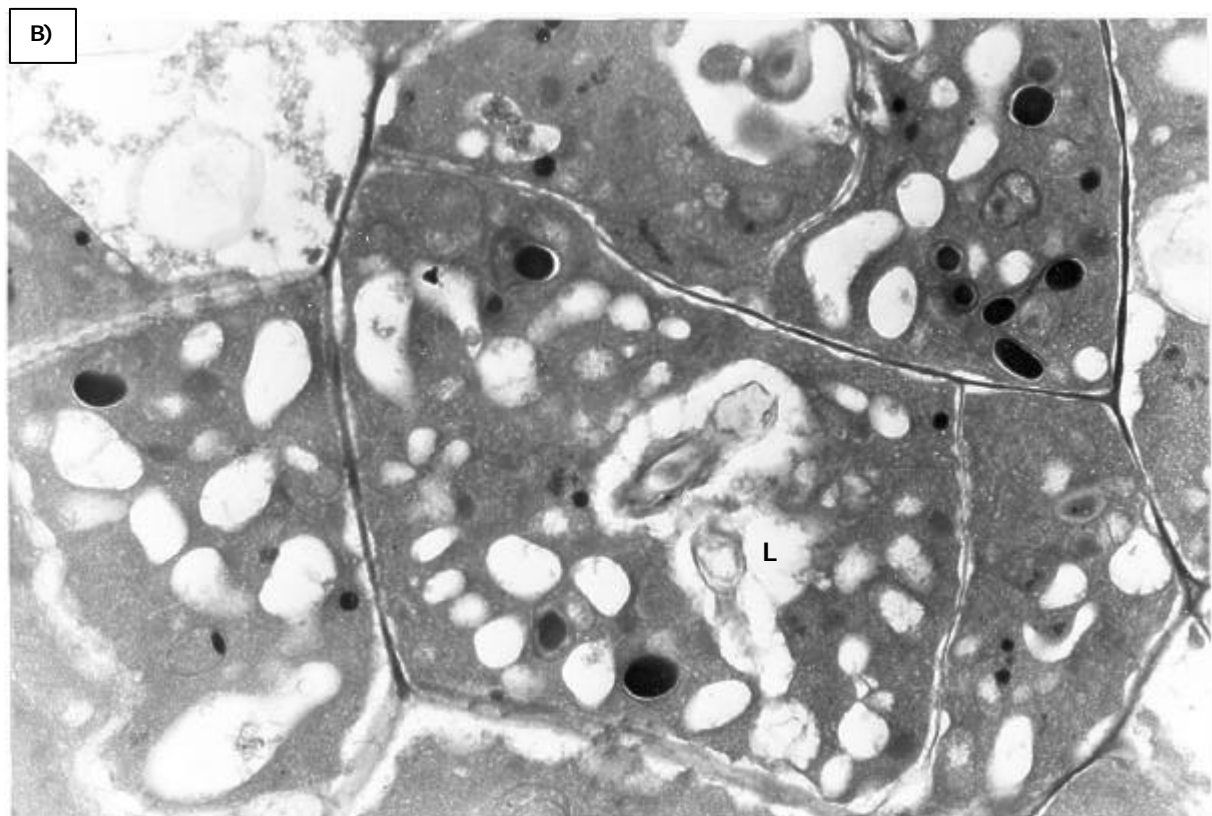
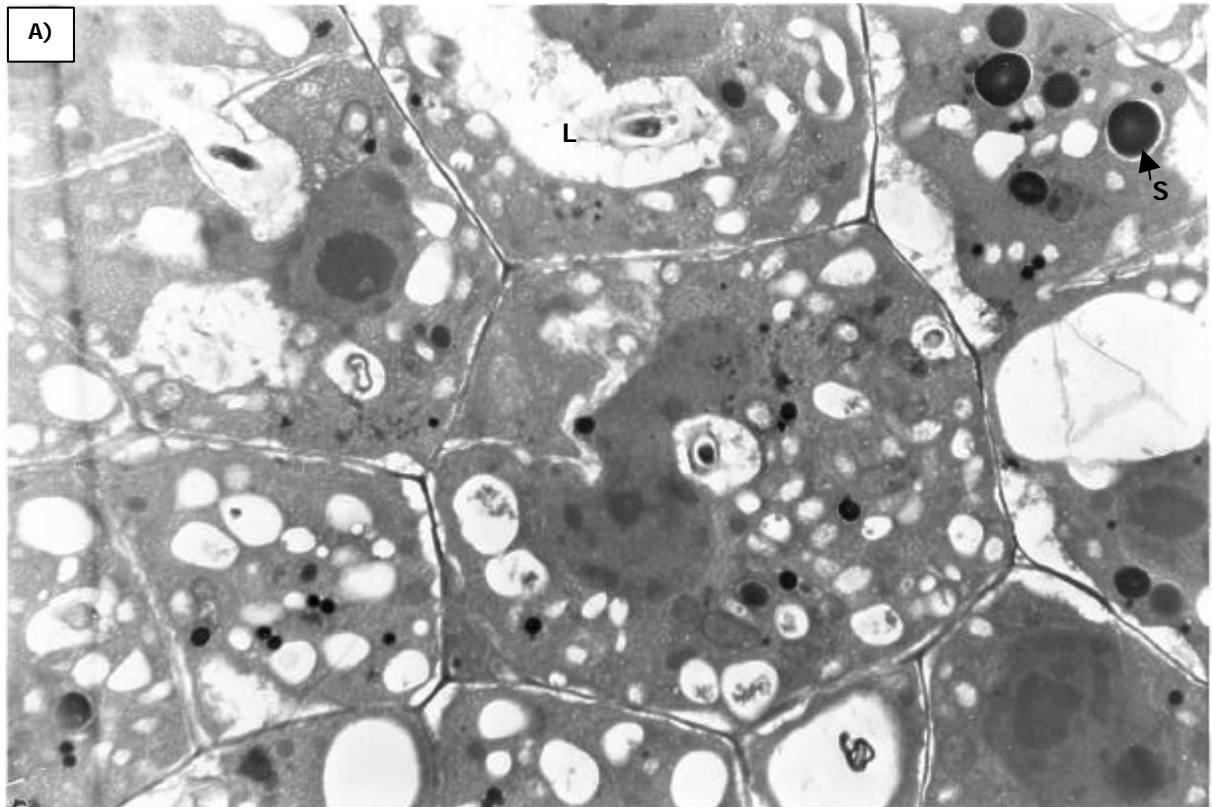


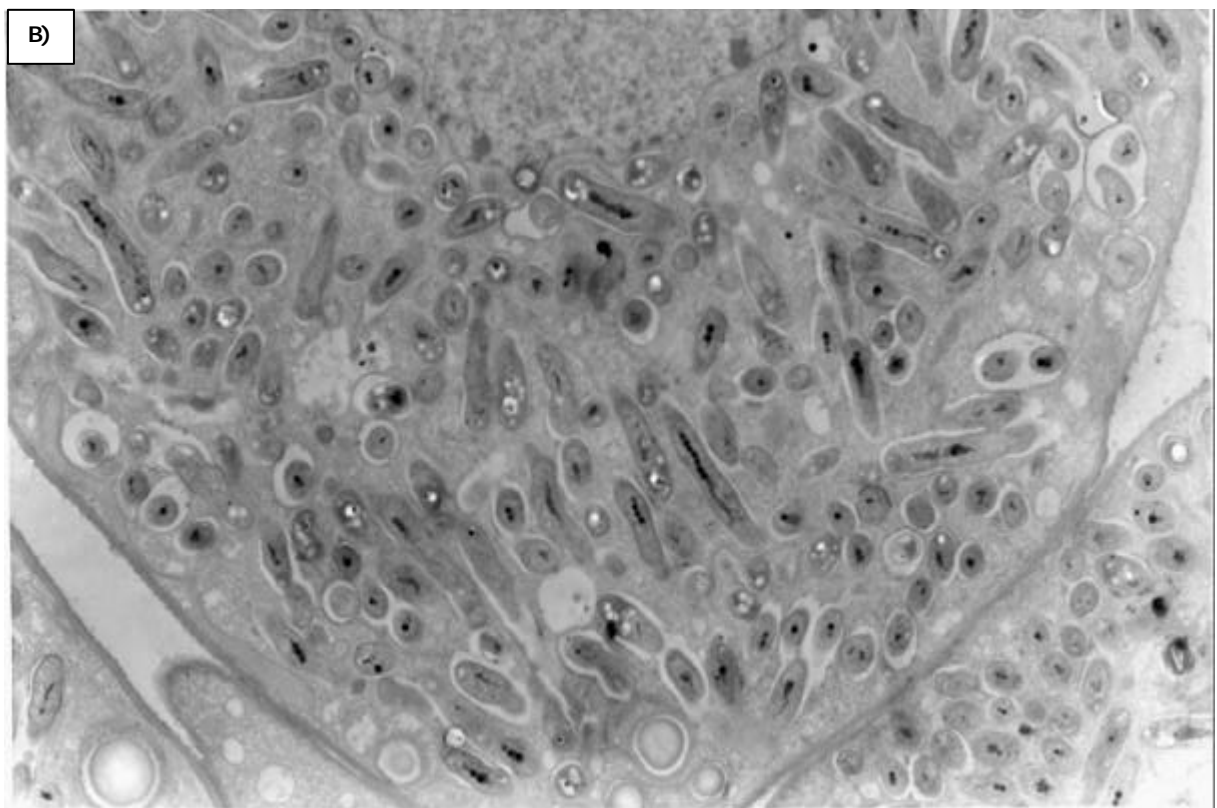
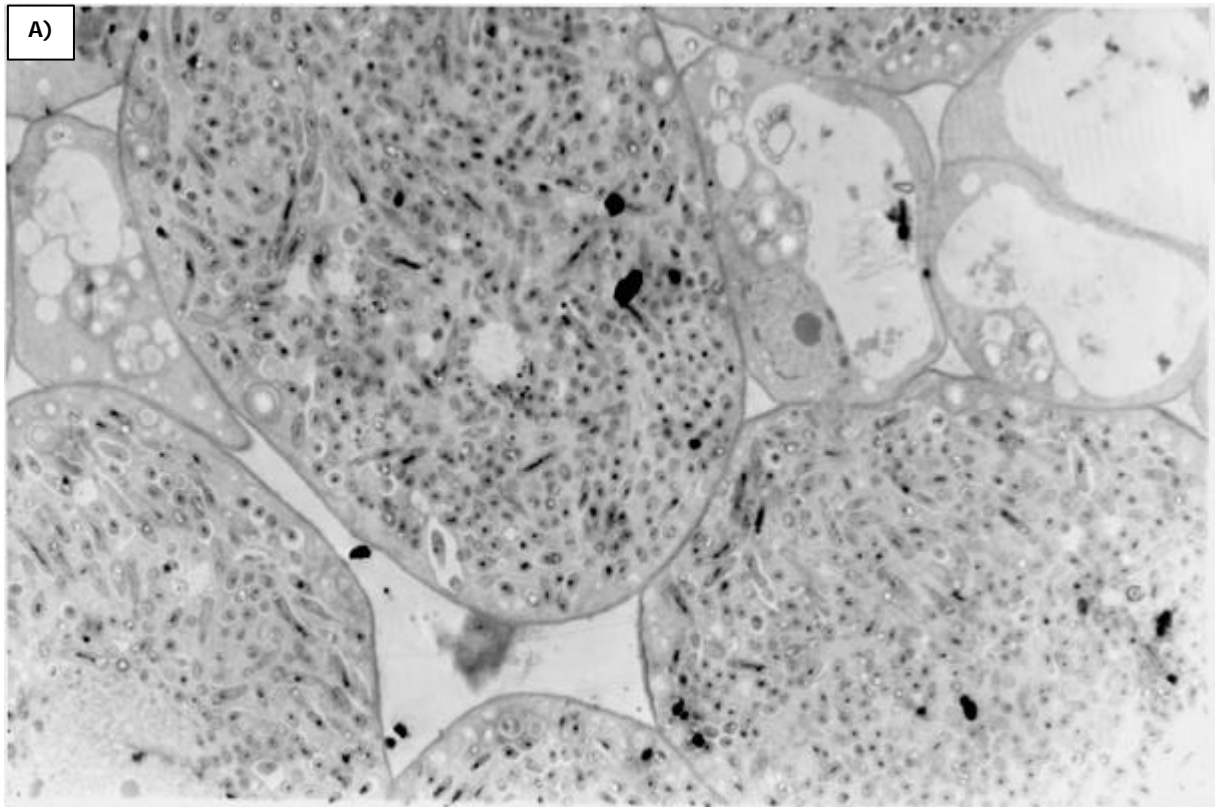


Abb.39: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten des inneren Gewebes von Wurzelknöllchen aus der Symbiose von *B. japonicum* fr Δ 24 mit *Glycine max* bv. Maple Arrow 21dpi. In den Aufnahmen wurden beispielhafte Strukturen markiert: potentielle Lysosomen (L), Infektionsschläuche (IS) und Stärkekörner (S). Vergrößerung: 5410x (A); 6960x (B); 8310x (C)

Der Klon *B. japonicum* fr Δ 24 resultierte aus der Integration des Plasmids pfr1 Δ S, das das Ende von ORF *ub1* und einen Teil der intergenischen Region vor ORF *ub2* enthält, in das Genom von *B. japonicum* 110spc4. Die homologe Rekombination bewirkte eine Vektorintegrationsmutagenese (VIM) zwischen ORF *ub1* und ORF *ub2*.

Die Auswirkungen dieser VIM in *B. japonicum* fr Δ 24 waren gravierend. Die Zellen des inneren Knöllchengewebes schienen zwar relativ gleichmäßig ausgebildet, enthielten aber nur eine sehr geringe Anzahl normal ausgebildeter Symbiosomen.

Es konnten Lysosomen identifiziert werden, in denen der Abbau von Bakteroiden stattfand (Abb.39A und B). Darüberhinaus enthielten die Zellen vermehrt Stärkekörner und eine große Anzahl meist relativ kleiner Vakuolen, in denen oft elektronendichtes Material ausgemacht werden konnte, das auf den vorangegangenen Verdau von Bakteroiden hindeutete.



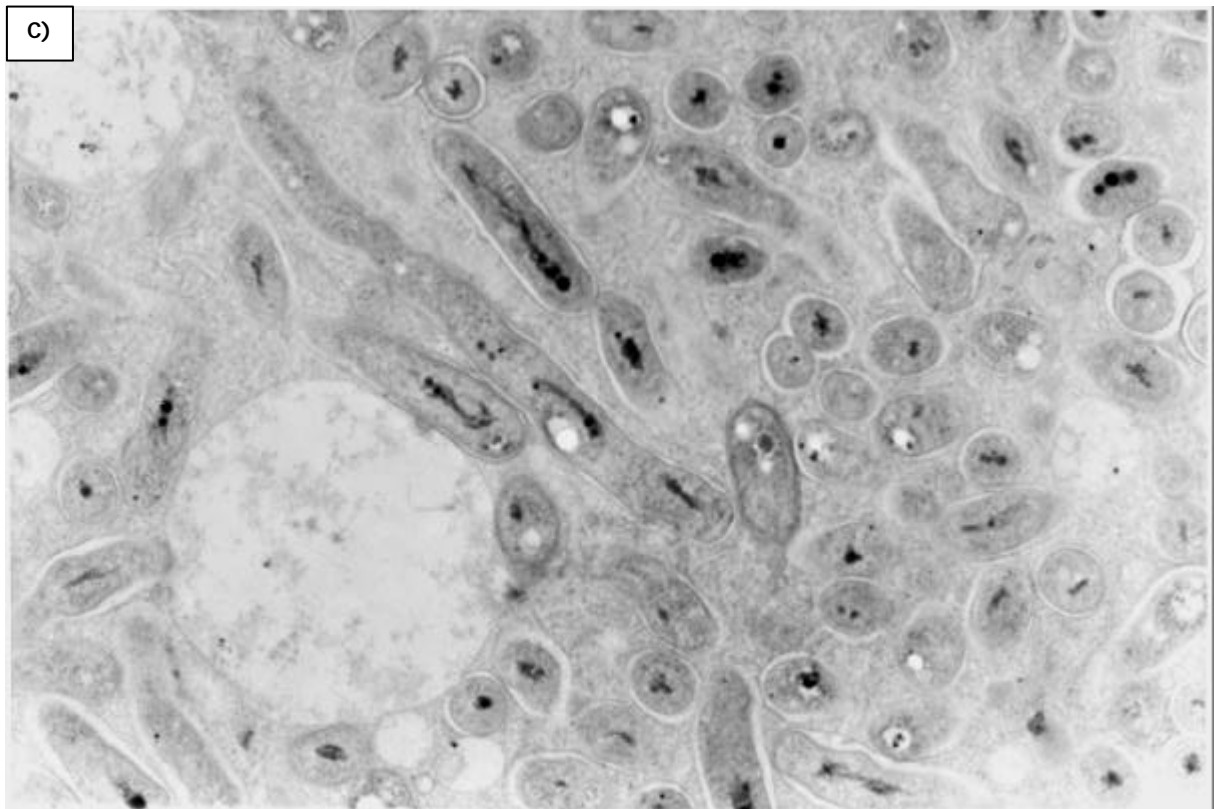


Abb.40: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten des inneren Gewebes von Wurzelknöllchen aus der Symbiose von *B. japonicum* *bvΔ* mit *Glycine max* *bv. Maple Arrow* 21dpi. Vergrößerung: 3480x (A); 6960x (B); 14490x (C)

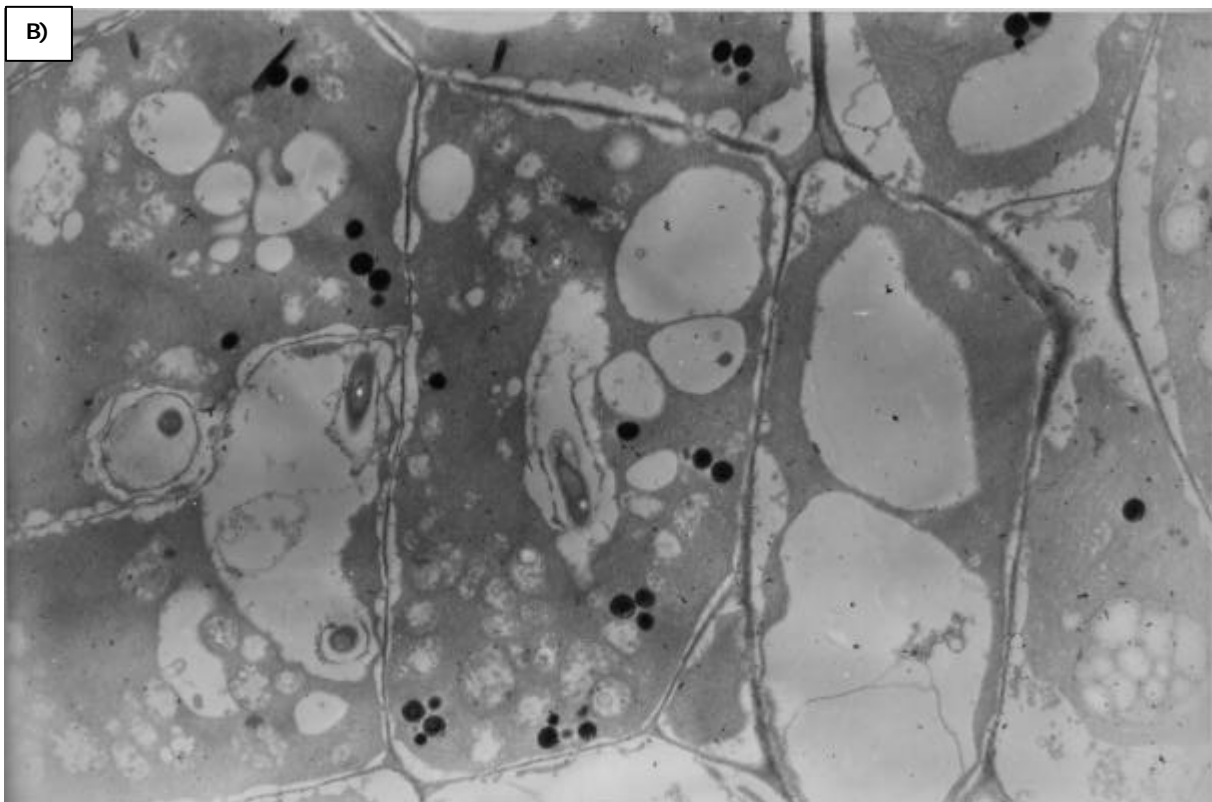
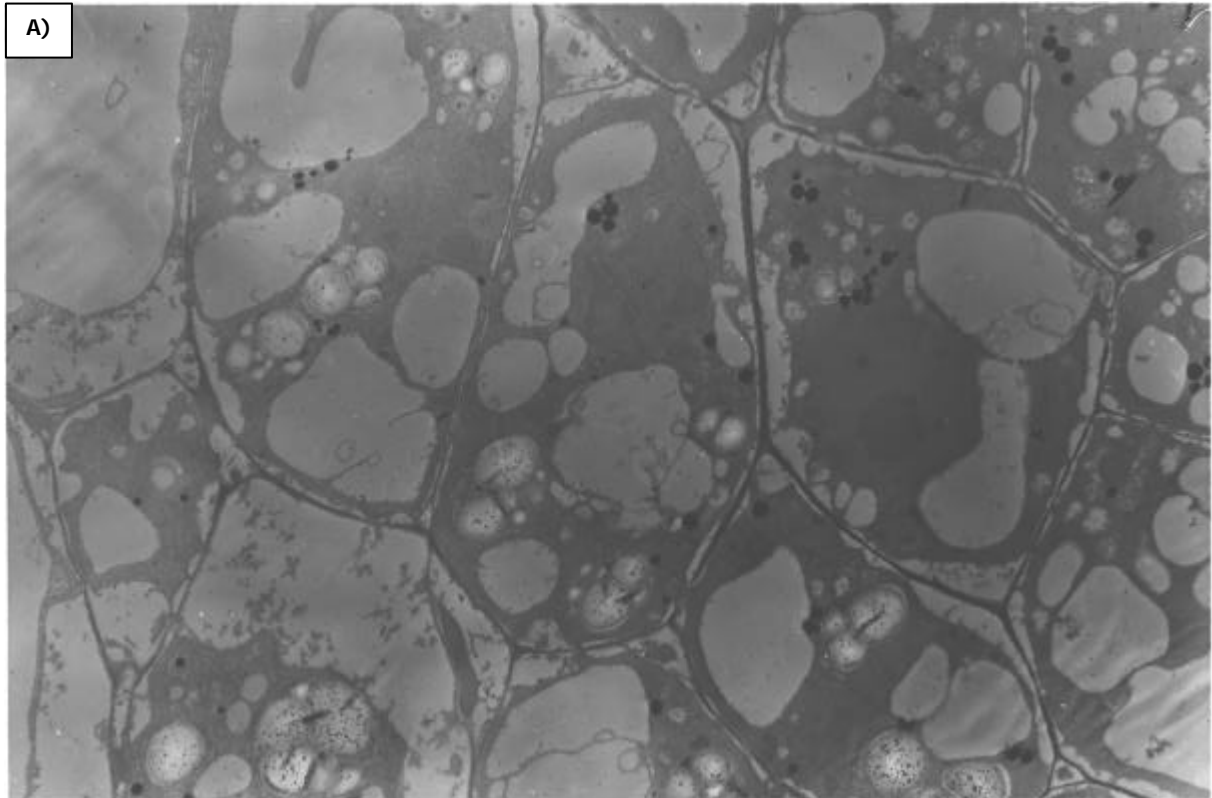
Der Klon *B. japonicum* *bvΔ* resultierte aus der Integration des Plasmids *pbvΔ* in das Genom von *B. japonicum* *110spc4*. Die homologe Rekombination bewirkte keine Unterbrechung eines ORFs, aber sie entkoppelte ORF *ub1* und ORF *ub2* von den downstream gelegenen ORFs.

Die Infektion des inneren Knöllchengewebes von *Glycine max* *bv. Maple Arrow* durch die Mutante *B. japonicum* *bvΔ* ähnelte in der Ultrastruktur dem WT.

Sowohl die Rate der infizierten Zellen im Gewebe als auch die Anzahl der Bakterioide pro infizierter Zelle erreicht annähernd den WT. Die meisten Symbiosomen schienen unbeeinträchtigt ausgebildet, in seltenen Fällen war die PBM vergrößert (Abb.40B) und es fanden sich einige deformierte bzw. verlängerte Bakterioide (Abb.40B und C).

Es fanden sich einige Vakuolen in den Pflanzenzellen, deren Inhalt an elektronendichtem Material auf einen Abbau von Bakteroiden hindeuten konnte.

Die Anzahl der Stärkekörner in den infizierten Zellen war sehr gering, in den benachbarten nicht-infizierten Zellen dagegen fand sich eine Vielzahl solcher Ansammlungen von Speicherstärke.



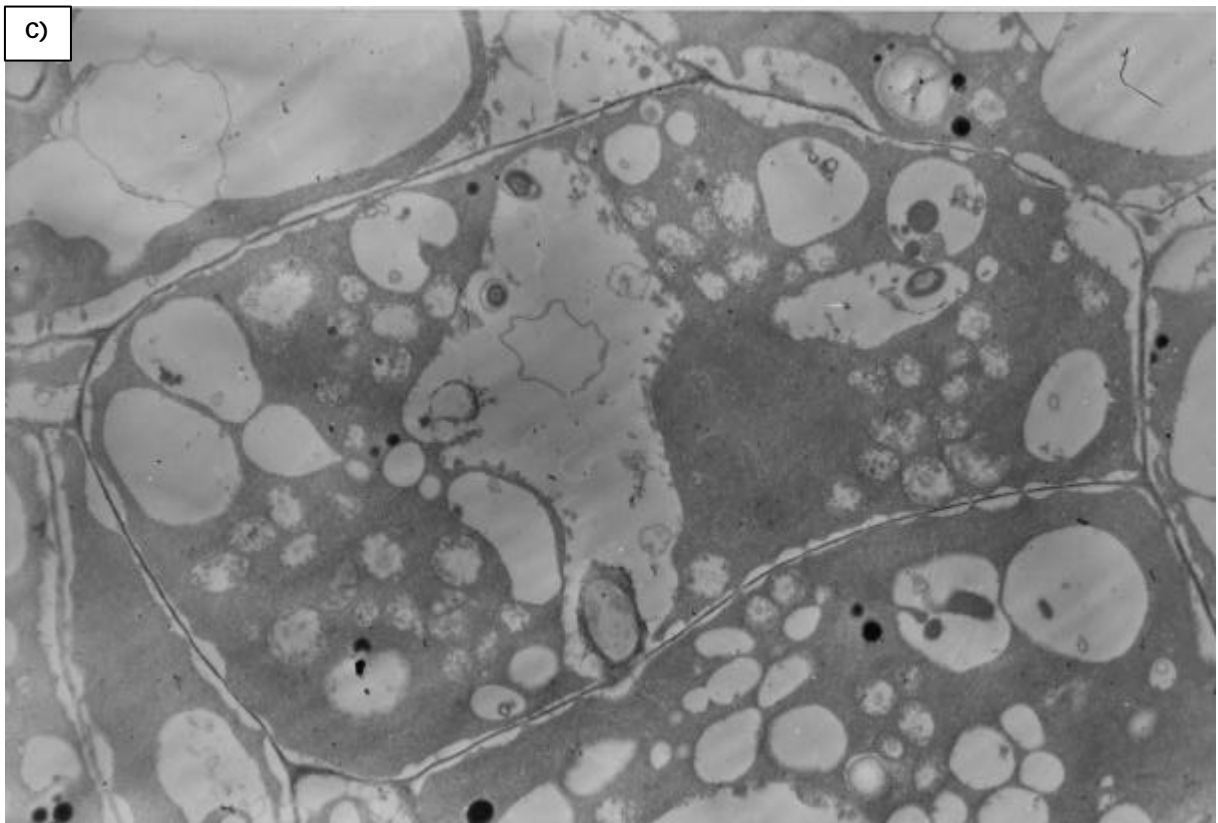


Abb.41: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten des inneren Gewebes von Wurzelknöllchen aus der Symbiose von *B. japonicum* 4JQ mit *Glycine max* bv. Maple Arrow 21dpi. Vergrößerung: 5410x (A); 6960x (B); 6960x (C)

B. japonicum 4JQ resultierte aus der Integration des Plasmids p4JQ, das ein internes Fragment von ORF *ub4* enthält, in das Genom von *B. japonicum* 110*spc4*. Die homologe Rekombination bewirkte eine VIM von ORF *ub4* und seine Entkopplung von ORF *ub5*.

In der Symbiose mit *B. japonicum* 4JQ war das innere Knöllchengewebe von *Glycine max* bv. Maple Arrow nur extrem gering infiziert. Es fanden sich fast keine unbeeinträchtigt ausgebildeten Symbiosomen in den untersuchten Pflanzenzellen.

Die wenigen vorhandenen Bakterioide waren von einer stark ausgedehnten PBM umgeben oder befanden sich in zumeist relativ großen Lysosomen, in denen das Vorhandensein von intakten und zerstörten Bakteroiden auf deren Abbau durch die Pflanze hindeutete (Abb.41B und C). Das elektronendichte Material in einer Anzahl kleiner Vakuolen deutete darauf hin, daß auch hier ein Abbau der Bakterioide in einem relativ frühen Stadium der Infektion stattgefunden haben könnte.

In den nicht-infizierten Pflanzenzellen waren zumeist große Ansammlungen von Stärkekörnern zu beobachten, in den infizierten dagegen kaum, trotz der minimalen Anzahl an Bakteroiden.

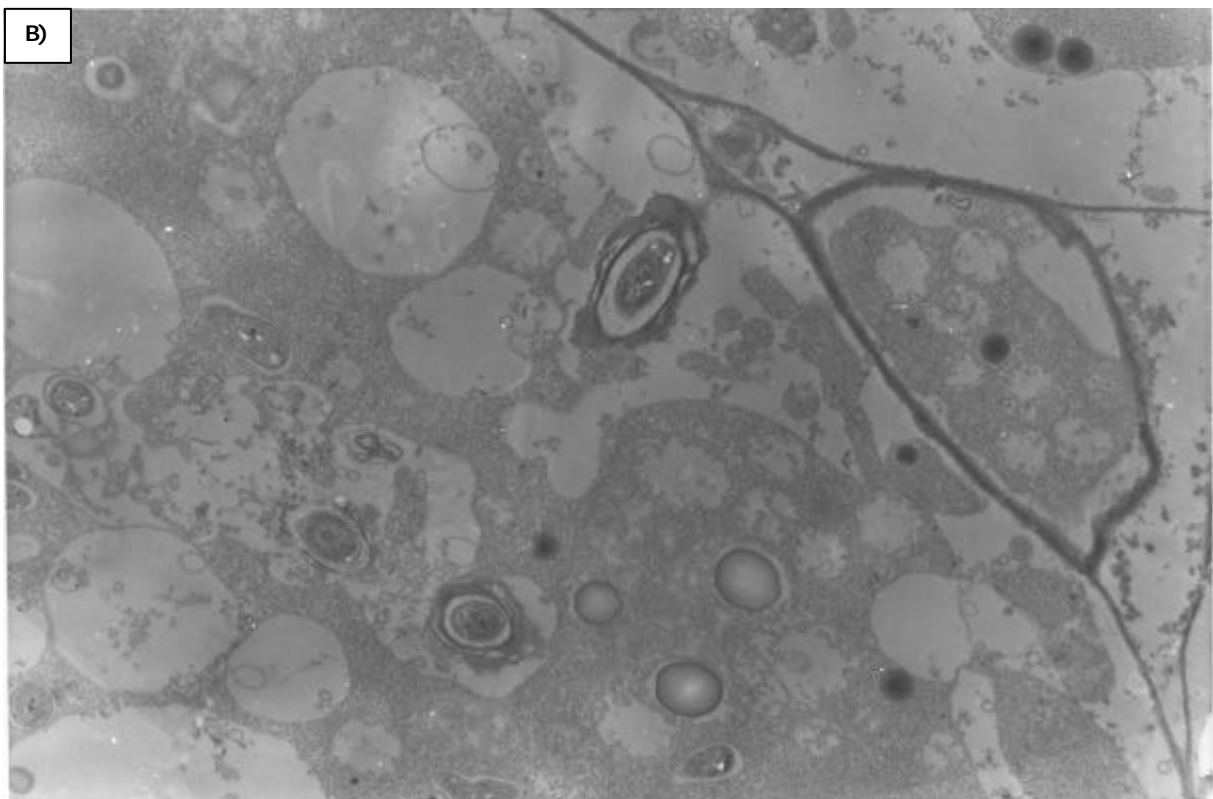
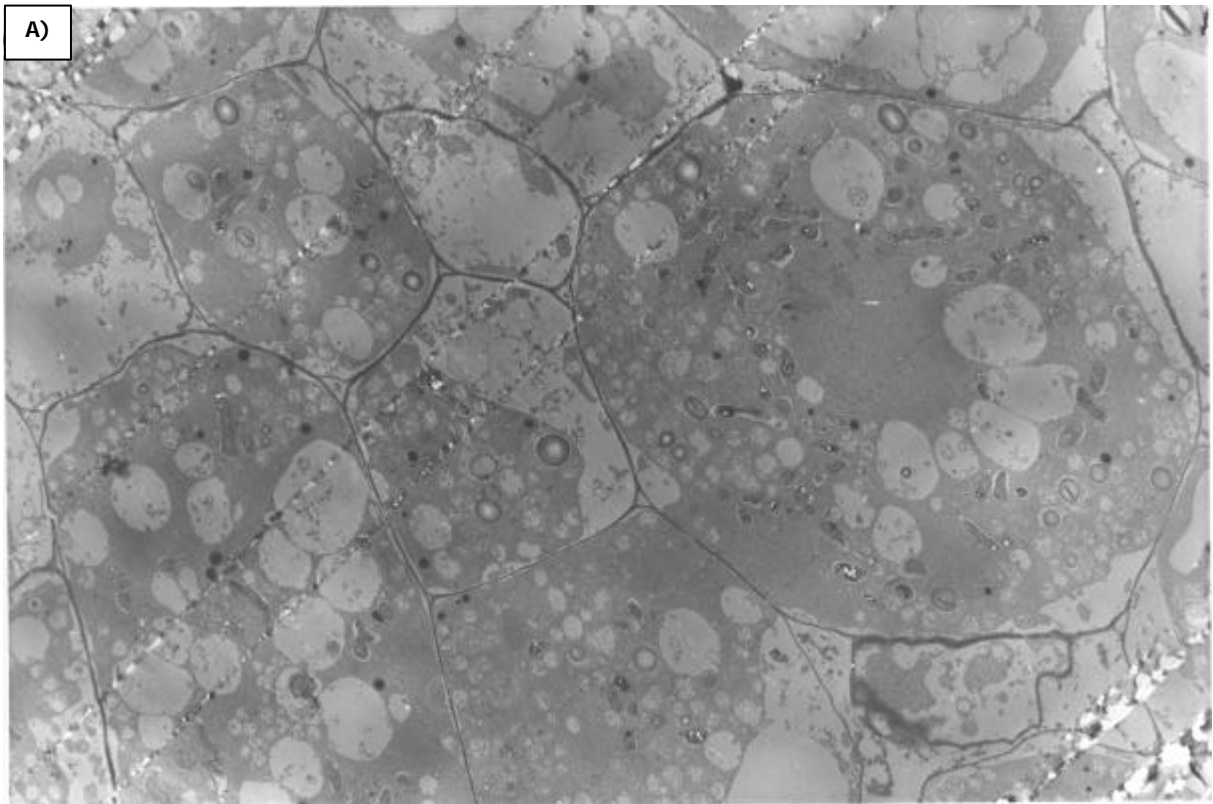




Abb.42: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten des inneren Gewebes von Wurzelknöllchen aus der Symbiose von *B. japonicum* 5JQ mit *Glycine max* bv. Maple Arrow 21dpi. Vergrößerung: 4250x (A); 11400x (B); 11400x (C)

Der Klon *B. japonicum* 5JQ resultierte aus der Integration des Plasmids p5JQ, das ein internes Fragment von ORF *ub5* enthält, in das Genom von *B. japonicum* 110*spc4*. Die homologe Rekombination bewirkte eine VIM von ORF *ub5*.

B. japonicum 5JQ war in der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow zur Infektion des inneren Gewebes der Wurzelknöllchen in der Lage. Es fanden sich infizierte wie auch nicht-infizierte Pflanzenzellen. Die Anzahl der Symbiosomen pro Zelle war zwar im Vergleich zum WT verringert, im Vergleich zu der Symbiose mit *B. japonicum* 4JQ dagegen deutlich erhöht. Es fanden sich einige unbeeinflusst erscheinende Bakterioide, der Großteil war allerdings deformiert (Abb.42B und C). Es gab auch Lysosomen, in denen ein Abbau der Bakterioide durch die Pflanzenzellen zu beobachten schien (Abb.42A).

Darüberhinaus enthielten die Pflanzenzellen ein ausgedehntes Vakuom, meist bestehend aus einer großen Zahl relativ kleiner Vakuolen, oft mit elektronendichtem Material darin. Diese Vakuolen wie auch die Symbiosomen waren meist recht gleichmäßig um den Zellkern herum angeordnet (Abb.42A).

Sowohl die nicht-infizierten wie auch die infizierten Zellen der Pflanzen enthielten Stärkekörner, wobei deren Anzahl reziprok zur Anzahl der Symbiosomen zu sein schien.

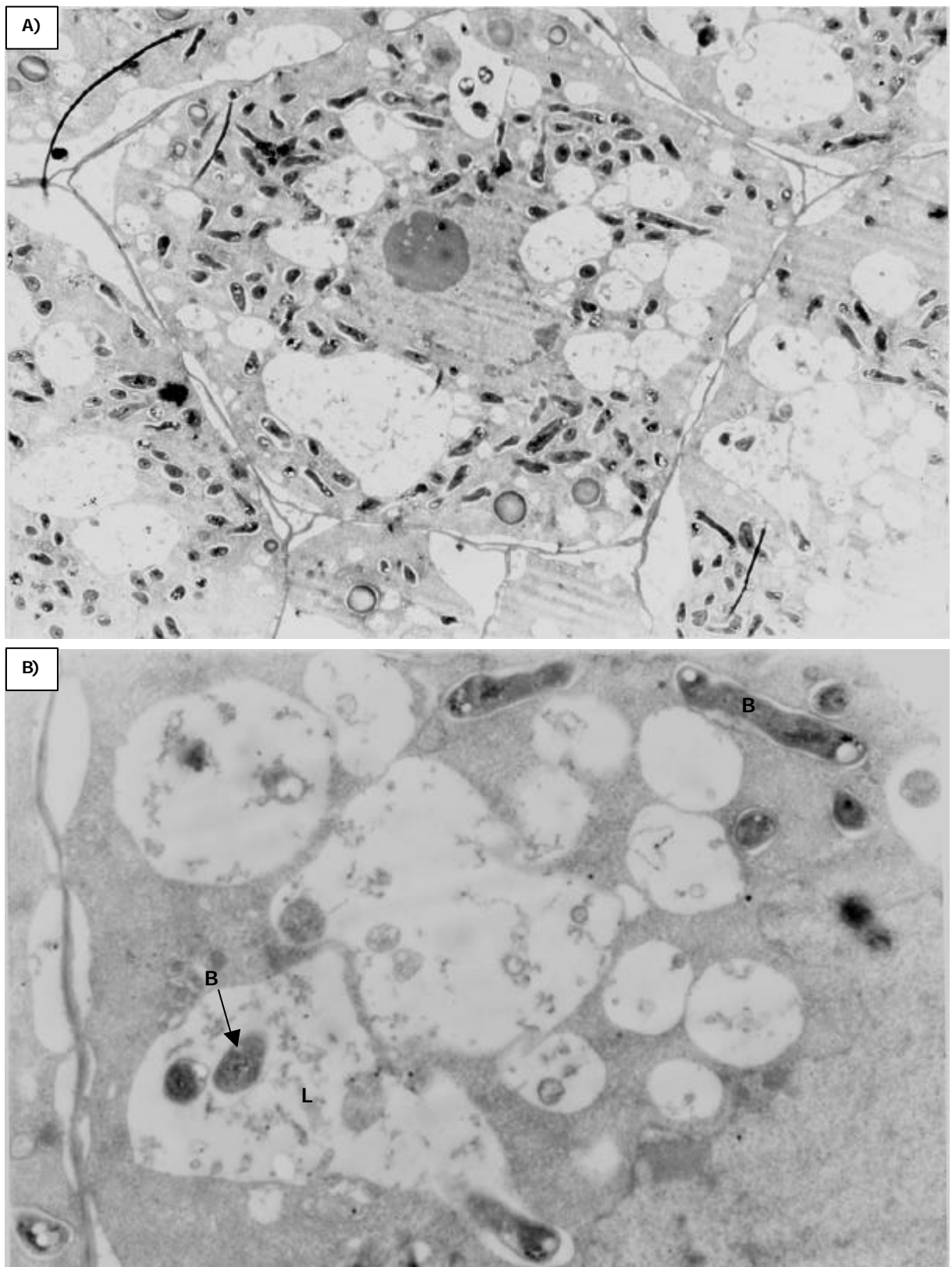


Abb.43: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten des inneren Gewebes von Wurzelknöllchen aus der Symbiose von *B. japonicum* 911 mit *Glycine max* bv. Maple Arrow 21dpi.

In den Aufnahmen wurden selektiv potentielle Lysosomen (L) und Bakterioide (B) markiert.

Vergrößerung: 5410x (A); 14490x (B)

Der Klon *B. japonicum* 911 resultierte aus der Integration des Plasmids p911 in das Genom von *B. japonicum* 110*spc4*. Die homologe Rekombination führte zu keiner Unterbrechung eines ORFs, sie integrierte eine zweite Kopie der DNA-Region vom 3'-Ende von *intA* bis einschließlich ORF *ub4* in das Genom.

In dem inneren Gewebe der Knöllchen von *Glycine max* bv. Maple Arrow, die aus der Inokulation mit *B. japonicum* 911 resultierten, befanden sich neben den Abschnitten mit infizierten Zellen auch regelmäßig Bereiche nicht-infizierter Zellen (jeweils ca. 5-10 Zellen). Die Anzahl der Bakterioide pro Zelle war im Vergleich zum WT deutlich verringert und bei einigen Symbiosomen war die PBM stark vergrößert (Abb.43A).

Auch die infizierten Zellen enthielten ein ausgedehntes Vakuom. Außerdem waren Lysosomen zu beobachten, in denen der Abbau von Bakteroiden stattfand (Abb.43B), sodaß das elektronendichte Material, das in den anderen Vakuolen auftrat, zumindestens zum Teil auch auf eine solche Verdauung der Bakterioide zurückzuführen war.

Die Ausbildung der Stärkekörner in den nicht-infizierten Zellen entsprach dem WT, allerdings waren auch in den infizierten Pflanzenzellen Stärkekörner in relativ großer Zahl vorhanden.

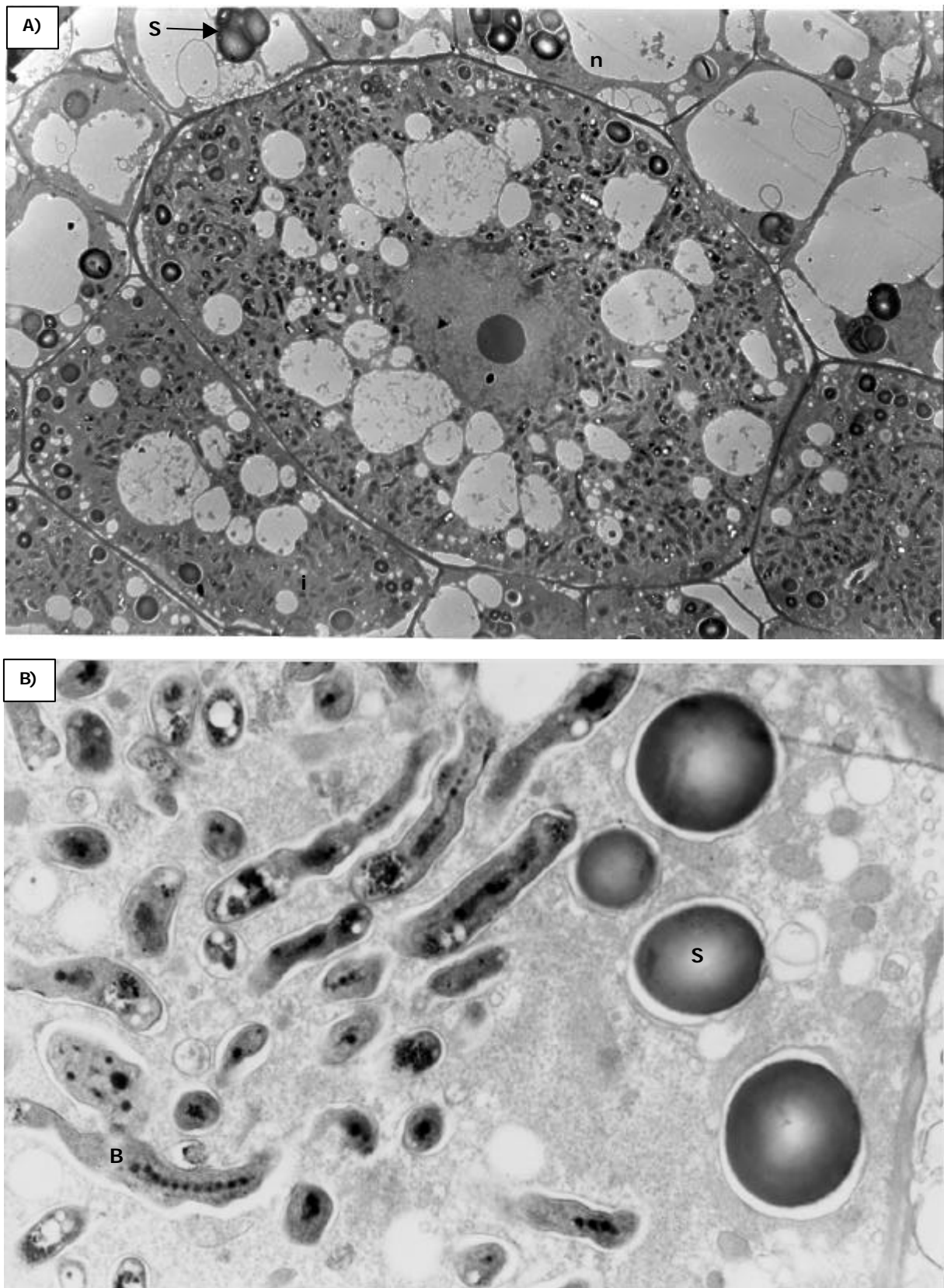


Abb.44: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten des inneren Gewebes von Wurzelknöllchen aus der Symbiose von *B. japonicum* 1011 mit *Glycine max* bv. Maple Arrow 21dpi.

In den Aufnahmen wurden selektiv jeweils infizierte (i) und nicht-infizierte (n) Zellen sowie einige Bakterioide (B) und Stärkekörner (S) markiert.

Vergrößerung: 2510x (A); 14490x (B)

Der Klon *B. japonicum* 1011 resultierte aus der Integration des Plasmids p1011 in das Genom von *B. japonicum* 110*spc4*. Die homologe Rekombination führte zu keiner Unterbrechung eines ORFs, sie integrierte eine zweite Kopie der DNA-Region vom 3'-Ende von *intA* bis einschließlich ORF *ub5* in das Genom.

Die aus der Symbiose von *Glycine max* bv. Maple Arrow mit *B. japonicum* 1011 resultierenden Wurzelknöllchen wiesen in der ultrastrukturellen Analyse des inneren Gewebes eindeutige Beeinträchtigungen im Vergleich zum WT auf, die allerdings weniger stark ausgeprägt waren als bei der Symbiose mit *B. japonicum* 911.

Es waren eindeutig infizierte Zellen wie auch nicht-infizierte vorhanden, wobei der Anteil infizierter Zellen im Vergleich zu der Symbiose mit *B. japonicum* 911 deutlich erhöht war. Die infizierten Zellen enthielten eine relativ große Anzahl von Symbiosomen aber auch eine Menge Vakuolen, die meist relativ gleichmäßig um den Zellkern herum angeordnet waren (Abb.44A).

Die Symbiosomen, die in ihrer Dichte in vielen Bereichen dem WT entsprachen, enthielten oft stark deformierte Bakterioide (Abb.44B).

Neben den wie beim WT ausgebildeten Stärkekörnern in den nicht-infizierten Zellen, befanden sich auch in den infizierten Zellen Stärkekörner in erhöhter Zahl, vor allem in Bereichen, in denen die Zahl der Symbiosomen gering war.

3.7. Besonderheiten des potentiellen Genproduktes der ORFs *ub1* und *ub2*

Die direkte Umgebung der *TnphoA*-Insertion im Genom von *B. japonicum* 2-10 schien in ihrer Organisation nicht dem zu entsprechen, was die DNA-Sequenzierung alleine vermuten ließ.

Die DNA-Sequenz der gesamten Region wurde bereits in Abb.19 in 3.4.4. dargestellt.

Daraus konnte geschlossen werden, daß es sich um zwei aufeinanderfolgende ORFs handelt, die mit ORF *ub1* und ORF *ub2* bezeichnet wurden.

Andere Faktoren dagegen schienen dies nicht zu bestätigen. Die Expression einer aktiven alkalischen Phosphatase in *B. japonicum* 2-10 muß aus einer Translokation des betroffenen Genproduktes in das Periplasma resultieren (Manoil *et al.*, 1986). Die computergestützten Analysen der abgeleiteten AS-Sequenzen konnten dagegen kein Signalpeptid und auch keine transmembrane Domäne in *Ub2* verifizieren. Alleine ein

membranassoziierten Bereich wurde in Ub2 vorausgesagt, der für den Transfer durch die Cytoplasmamembran allerdings nicht ausreichend erschien.

In Ub1 dagegen wurde eine transmembrane Domäne bei AS 49-68 berechnet, die in einer Lokalisierung des downstream exprimierten Bereiches im Periplasma resultieren kann.

Daraus wurde die Hypothese entwickelt, daß es zu einer Kopplung der potentiellen Genprodukte von ORF *ub1* und ORF *ub2* kommt, resultierend in einem als Ub12 bezeichneten Protein.

Auch die Auswirkungen der Mutation in *B. japonicum* frΔ24, die zwischen ORF *ub1* und ORF *ub2* stattfand, entsprachen in etwa denen von *B. japonicum* 2-10, das die *TnphoA*-Insertion in ORF *ub2* trägt, in der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow.

Verschiedene Möglichkeiten der Kopplung, die in der Literatur beschrieben sind, wurden mit den Gegebenheiten in der untersuchten DNA-Region verglichen.

Aus diesen Vergleichen resultierte die Hypothese, daß es sich um ein Überlesen des UGA Codons von ORF *ub1* bei der Translation handeln könnte, da die anderen bekannten Mechanismen mit den Gegebenheiten nicht vereinbar waren (siehe 4.4.1.).

Mit einem Überlesen dieses einen Stoppcodons käme es zur Expression eines gemeinsamen Genproduktes Ub12 des in diesem Fall als ORF *ub12* bezeichneten 921 bp langen DNA-Bereiches, der sowohl ORF *ub1* und ORF *ub2* als auch das vorher als intergenische Region angesehene DNA-Fragment zwischen den beiden ORFs beinhaltet (bp 2825-3745 der in 3.4.4. angegebenen DNA-Sequenz).

Diese Hypothese ermöglichte eine Erklärung der beobachteten Gegebenheiten in Genotyp und Phänotyp.

3.7.1. Die DNA-Sequenz und die daraus abgeleitete AS Sequenz

Die DNA-Sequenz des Bereiches der ORFs *ub1* und *ub2* ist in Abb.45 dargestellt. Die daraus abgeleitete AS-Sequenz wurde in diesem Fall angegeben, ausgehend von der Hypothese, daß das Stoppcodon am Ende von ORF *ub1* in der Translation überlesen wird. Damit käme es zur Expression von *ub12*, resultierend in einem Genprodukt Ub12. Die mittels Genecompar 1.3 berechnete molekulare Masse eines solchen Proteins lag bei 32,5 kDa.

```

2761 AATCCGGCCGCGCTCGACAAGCTCAAGCTTCGTATCCAGGCGTTGCGCGCCAAGACGATC 2820
      M A A P R K R R C R P P P R S P S C W
2821 GCCAATGGCTGCACCGAGGAAGAGGCGCTGTGCGCCGCCCAAGGTCGCCGAGCTGCTG 2880
      I A T I C R S P T S T C G R R R A N G G
2881 GATCGCCACGATTTGTGCTCTCCGACGTCGACCTGCGGGCGTCGCCGTGCGAACGGAGG 2940
      S L R P I A R S E F L W T I A S A R L L
2941 GTCTTTGAGACCCATCGCAAGAAGCGAATTCCTCTGGACGATTGCATCGGCGCGCTTGCT 3000
      I S A I V G S G A R R M R P A R A A M C
3001 CATTTCTGCGATTGTGCGGTCTGGCGCGAGAAGAATGCGGCCGGCGAGAGCAGCTATGTG 3060
      S L V S A R M S R S R I I W R N O S T A
3061 TTCTTTGGTCTCGGCGCGGATGTGCGAGGTGCGCATTATCTGGCGGAATTGATCGACGGC 3120
      P C A P S L V A S R P R S T T A G S G T
3121 GCCGTGCGCGCCGAGCTTGGTCGCTTCAAGACCTCGGTCGACTACAGCAGGTTCCGGCAC 3180
      R S G I W P M P P S R S A W W R Q S R T
3181 CAGGAGCGGCATCTGGCCAATGCCTCCTTCGCGCTCGGCATGGTGGCGTCAATCGCGGAC 3240
      G Y R R S R P V A I R S T K A P V A G W
3241 AGGCTACAGGCGATCAAGGCCGGTTCGCGATCAGGTCAACGAAAGCACCGGTTCGCGGGCTG 3300
      S C S R P R W S M P N S T S S T S S S G
3301 GTCGTGCTCAAGACCTCGGTGGTCGATGCCGAATTCGACAAGCTCGACCTCAAGCTCCGG 3360
      P S A A P A G W C R W R P M K P A A P R
3361 ACCCAGCGCAGCACCGGCCGGATGGTGTGATGGCGGCCTATGAAGCCGGCGGGCGCCGCG 3420
      A G R W P S I P A L A R R S Q G P L P K
3421 GGCGGGTCGCTGGCCATCAATCCCGGCCTTGGCGAGGCGCAGTCAGGGACCACTCCCAA 3480
      D A D R I G A R D D A P M Y F G I I A A
3481 GGACGCTGATCGCATCGGGGCAAGGGACGATGCGCCGATGTATTTCGGAATAATAGCAGC 3540
      Y P C F A R R A K G P C G G G T P K L L
3541 ATACCCCTGTTTTGCCCGACGTGCCAAAGGGCCTTGCGGGGGTGGGACGCCCAAGCTGTT 3600
      I P N A L A T V H G V A F E N S S G P R
3601 GATCCCAAACGCATTGGCTACTGTGCATGGGGTTGCTTTCGAAAATTCCAGCGGGCCGCG 3660
      R N A R S S A L S R R A Q R N R S S R L
3661 CCGAAATGCCCGCTCGTCGGCGTTAAGCCGGCGCGCGCAAAGAAATAGGTGAGCCGGCT 3720
      S M A P L T I *
3721 CTCGATGGCGCCTCTAACTATCTGATATTTCTGTTTCTTTATTCGGTTGCGGCAGGGCTTC 3780

```

Abb.45: DNA-Sequenz und abgeleitete AS-Sequenz des DNA-Bereiches (angegeben im Einbuchstaben-Code) von bp 2761-3780 aus Abb.19 in 3.4.4., ausgehend von einem Überlesen des Stoppcodons bei bp 3110-3112 als AS 96 (von 306 AS) des abgeleiteten Genproduktes.

Die mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz ist unterstrichen. Die Stelle der potentiellen Selenocystein-Insertion ist durch ein **O** gekennzeichnet. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *HindIII* und *SaI* sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Aus der abgeleiteten AS-Sequenz ging hervor, daß das potentielle Protein Ub12 10 Cystein-Reste enthält. Bei einer Gesamtlänge von 306 AS ist das ein auffällig hoher Wert, die Cystein-Reste können beispielsweise über die Ausbildung von Disulfidbrücken starke intra- und intermolekulare Bindungen generieren.

Die Berechnung des Hydropathie-Index nach Kyte und Doolittle (1982) zeigte einen potentiell transmembranen Bereich in Ub12 bei AS 49-68 an, sowie einen hydrophoben Bereich bei AS 247-277, der an der Cytoplasmamembran angelagert sein könnte (Abb. 46). Die Analyse nach Rao und Argos (1986) erbrachte, daß es sich bei der transmembranen Domäne vermutlich um eine α -Helix handelt.

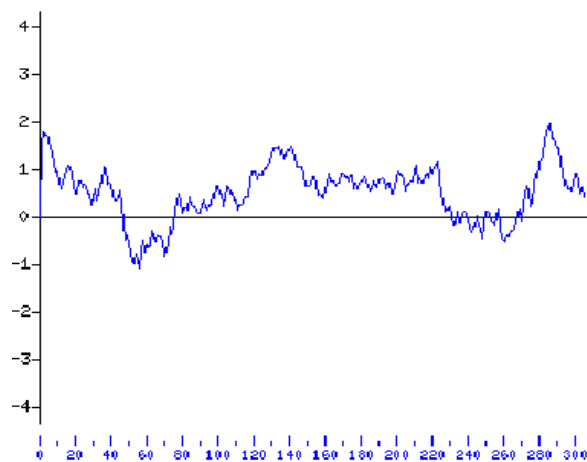


Abb.46: Darstellung des Hydropathie-Index der abgeleiteten AS-Sequenz von ORF *ub12*. Auf der x-Achse ist die AS-Sequenz von AS 1-306 aufgetragen. Die Werte der y-Achse geben die Hydrophilie an, berechnet nach Kyte und Doolittle (1982). In dem Bereich von AS 49-68 konnte ein transmembranes Segment identifiziert werden. Die Berechnungen nach Rao und Argos (1986) deuteten darauf hin, daß es sich um eine α -Helix handelte. Bei AS 247-277 befindet sich ein Bereich, der an der Cytoplasmamembran angelagert sein kann.

Mit Hilfe der Datenbak PROSITE, die über das Internet (www.expasy.ch/prosite/) abgefragt werden kann, konnte die abgeleitete AS-Sequenz auf funktionelle Gruppen hin untersucht werden. Diese Analyse zeigte mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen im N-terminalen (zwischen AS40 und AS85) und im C-terminalen (zwischen AS288 und AS298) Bereich auf, sowie zwei potentielle Myristylierungsstellen im zentralen Bereich (zwischen AS118 und AS240) der abgeleiteten AS-Sequenz Ub12.

Diese *in silico* Analyse des potentiellen Genproduktes von ORF *ub12* konnte Anhaltspunkte für die weiteren Untersuchungen und die Erklärung der ermittelten Daten geben, sollte aber nicht überbewertet werden.

3.7.2. Reportergenfusion downstream des UGA Codons von *ub1*

Um das Überlesen des TGA Codons (bp 3110-3112 der in 3.4.4. angegebenen DNA-Sequenz) innerhalb eines möglichen ORFs *ub12* nachzuweisen, wurden mittels PCR translationale Reportergenfusionen mit *lacZ* konstruiert. Der verwendete Vektor war pUC18, über dessen *lacZ* Promotor und das *lacZ* Startcodon auch die Kontrolle der Expression erfolgte. Die Versuche fanden in *E. coli* DH5 α statt.

Mit dem Primer-Paar SCKon-fw und SCKon-rev2 wurde ein 284 bp langes DNA-Fragment amplifiziert (bp 3017-3300 der in 3.4.4. angegebenen DNA-Sequenz), das *in frame* (upstream und downstream) in das *lacZa* Gen in pUC18 kloniert wurde, resultierend in dem Hybridplasmid pfr2U2 (Abb.47A).

Da innerhalb des DNA-Fragmentes, downstream des TGA Codons, ein weiteres ATG Startcodon inkl. einer möglichen Shine-Dalgarno-Sequenz *in frame* mit dem anschließenden Reportergen *lacZ* vorhanden war (bp 3200-3202 der in 3.4.4. angegebenen DNA-Sequenz), wurde zusätzlich ein Hybridplasmid mit einem verkürzten Insert konstruiert. Zu diesem Zweck wurde der upstream-Bereich des in pfr2U2 enthaltenen Inserts, mittels der internen *SalI* Schnittstelle, *SmaI-SalI* in pUC18 kloniert, resultierend in dem Hybridplasmid p Δ FR50 (Abb.47B). Die *SalI* Schnittstelle innerhalb der DNA-Sequenz von *B. japonicum* 110*spc4* endet 50 bp downstream des TGA Codons (bp 3157-3162 der in 3.4.4. angegebenen DNA-Sequenz), das verbleibende Fragment aus *B. japonicum* 110*spc4* DNA war damit noch 146 bp lang.

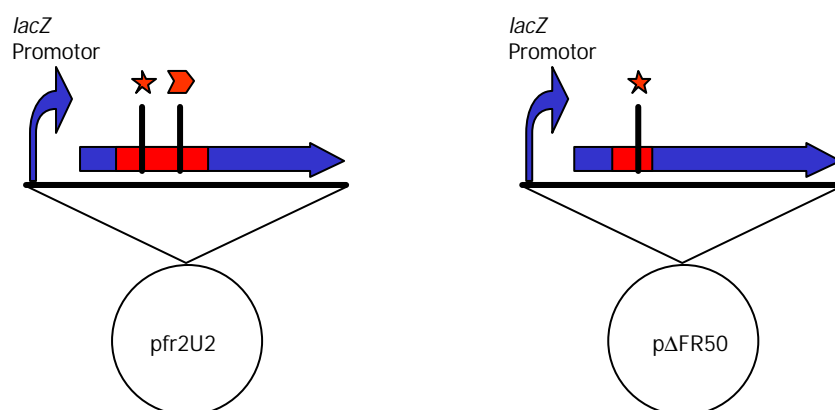


Abb.47: Graphische Darstellung von Hybridplasmiden mit translationalen Reportergenfusionen von *B. japonicum* 110*spc4* DNA-Fragmenten (dargestellt in rot) mit *lacZa* des Vektors pUC18 (dargestellt in blau), unter Kontrolle des *lacZ* Promotors des Vektors. Das TGA Codon innerhalb des DNA-Fragmentes aus *B. japonicum* 110*spc4* ist durch einen Stern symbolisiert, ein potentielles ATG Startcodon in diesem DNA-Fragment durch einen Pfeil. Die Hybridplasmide enthalten DNA-Fragmente aus dem Genom von *B. japonicum* 110*spc4* von 284 bp (pfr2U2) bzw. 146 bp (p Δ FR50) Länge.

Die β -Galactosidase Aktivität der *E. coli* Klone mit den verschiedenen Konstrukten wurde in Flüssigkulturen (LBG-Medium) mittels des ONPG-Tests nach Miller (1972) gemessen.

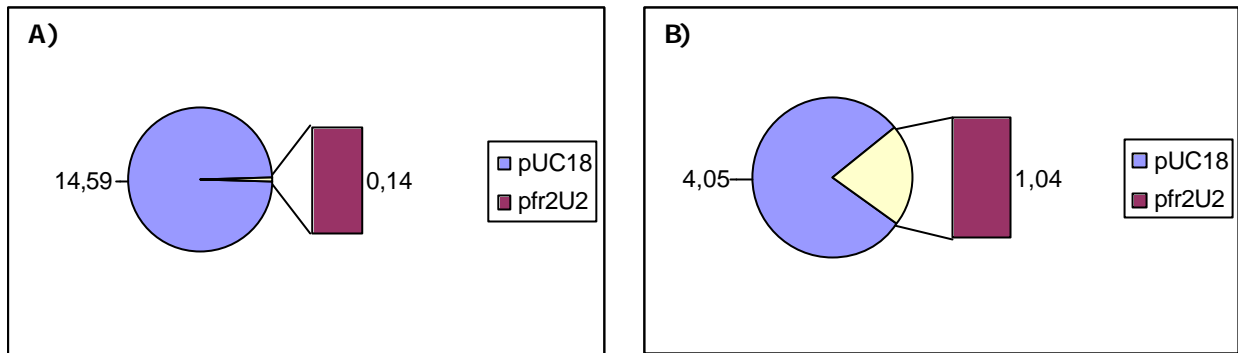


Abb.48: Graphische Darstellung der β -Galactosidase Aktivität (in U) von *E. coli* DH5 α Kulturen mit unterschiedlichen Plasmiden, gemessen nach Miller (1972). Angegeben sind die Mittelwerte aus vier gleichartig durchgeführten Testreihen.

- A) Nach aerober Inkubation in LBG-Medium bei 37 °C ü.N. Die Standardabweichung lag bei 0,73 (pUC18) bzw. 0,03 (pfr2U2).
- B) Nach aerober Inkubation in PA-Medium bei 37 °C für 3 d. Die Standardabweichung lag bei 0,39 (pUC18) bzw. 0,22 (pfr2U2).

In unter aeroben Bedingungen bei 37 °C ü.N. angezogenen Kulturen konnten die besten Ergebnisse erzielt werden (Abb.48A), allerdings war die Aktivität, die aus dem Hybridplasmid pfr2U2 resultierte, mit durchschnittlich 0,14 U nur etwa 1 % der Enzymaktivität von durchschnittlich 14,6 U, die der Vektor pUC18 in *E. coli* DH5 α unter diesen Bedingungen bewirkte. Die *E. coli* DH5 α Klone mit dem Hybridplasmid p Δ FR50 zeigten bei dieser Messmethode keinen signifikanten Unterschied in der β -Galactosidase Aktivität im Vergleich zu *E. coli* DH5 α ohne Plasmid.

Eine Anzucht in PA-Medium unter aeroben Bedingungen bei 37 °C für 3 d führte zu einer erhöhten β -Galactosidase Aktivität bei den pfr2U2 tragenden Klonen, allerdings auch gleichzeitig zu einer Erniedrigung der Aktivität in den pUC18 tragenden Referenzen (Abb.48B). Bei Anzuchten in PA-Medium betrug die β -Galactosidase Aktivität resultierend aus pfr2U2 durchschnittlich 23 % der Aktivität, die aus pUC18 resultierte (bei einer Standardabweichung von 3,71). Allerdings konnten auch unter diesen Anzuchtbedingungen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Nullkontrolle (DH5 α) und dem Reporter-genkonstrukt p Δ FR50 gemessen werden.

3.7.3. Expression eines gemeinsamen Genproduktes Ub12 der ORFs *ub1* und *ub2* in *E. coli*

Durch eine Überexprimierung in *E. coli* konnte die Möglichkeit der Exprimierung von Ub12 belegt werden.

Zu diesem Zweck wurde das Hybridplasmid pORF12 konstruiert (Abb.49A). Zuerst wurde ein 863 bp großer DNA-Bereich von ORF *ub1* und *ub2* (bp 2825-3687 der in 3.4.4. angegebenen DNA-Sequenz) durch PCR aus dem WT *B. japonicum* 110*spc4* mittels der Primer NcoIORF210N und BglIIORF210C amplifiziert, der den potentiell codierenden Bereich bis auf die letzten 58 bp enthielt. Durch die Primer wurden zusätzlich Restriktionsschnittstellen (*NcoI* und *BglII*) eingefügt, über die das insgesamt 873 bp lange DNA-Fragment anschließend in den Expressionsvektor pQE60 des QIAexpress Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) kloniert wurde.

Als zusätzliche Kontrolle wurde ein Deletionsderivat von pORF12 konstruiert, das Hybridplasmid pORF12 Δ S13 (Abb.49B). Durch eine *SalI* Deletion wurde der den ORF *ub1* tragende DNA-Bereich entfernt, so daß nur der ORF *ub2* (bp 3157-3687 der in 3.4.4. angegebenen DNA-Sequenz) exprimiert werden konnte.

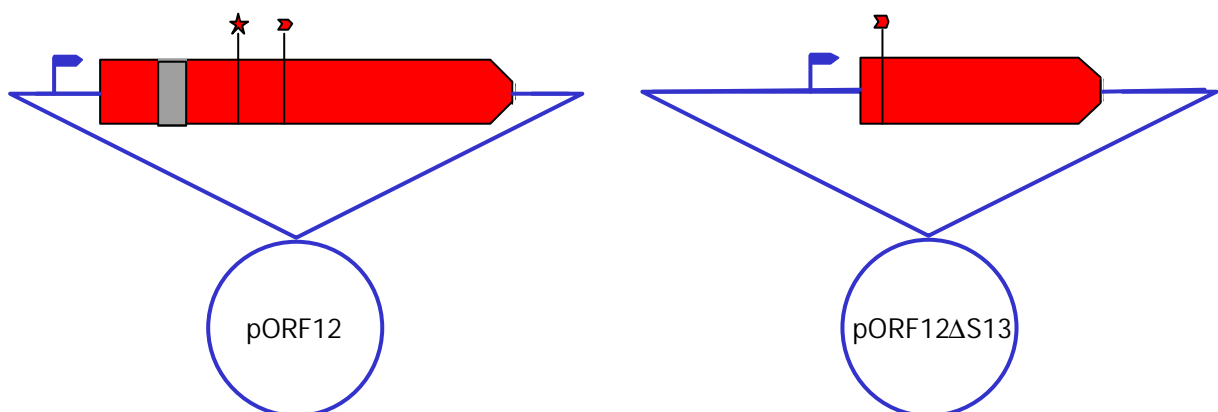


Abb.49: Graphische Darstellung des Hybridplasmides pORF12 und seines Derivates pORF12 Δ S13.

Die DNA-Fragmente aus *B. japonicum* 110*spc4*, gewonnen mittels PCR, sind in rot dargestellt. Der verwendete Expressionsvektor pQE60 in blau. Die schraffierte Fläche codiert eine potentielle transmembrane Helix, der Stern markiert das *in frame* TGA Codon und der Pfeil ein mögliches ATG Startcodon.

Die Kontrolle der Expression verlief bei dem verwendeten System über den *lacZ* Promotor, Operator und Repressor.

Eine Überexprimierung in dem Maße, wie es bei Verwendung dieses Kits erwartet wäre, konnte nie erreicht werden. D.h. es konnte nie ein bereits auf dem SDS-PAG prominentes Genprodukt erhalten und gereinigt werden.

Nach vielen fehlgeschlagenen Versuchen konnte allerdings ein Expressionsprodukt, das zwar im SDS-PAG nicht stark angereichert vorlag (Abb.50A), durch Western Blotting nachgewiesen werden (Abb.50B). Der Western Blot zeigte zwei dicht zusammen liegende Banden im Bereich von ca. 35 kDa, was mit dem berechneten angenommenen Molekulargewicht von Ub12 (33,2 kDa) gut vereinbar war.

Das potentielle Expressionsprodukt von *ub2* hätte laut Berechnung ein Molekulargewicht von ungefähr 19,6 kDa. Von dem Hybridplasmid pORF12ΔS13 konnte unter keinen Umständen ein Expressionsprodukt gewonnen werden.

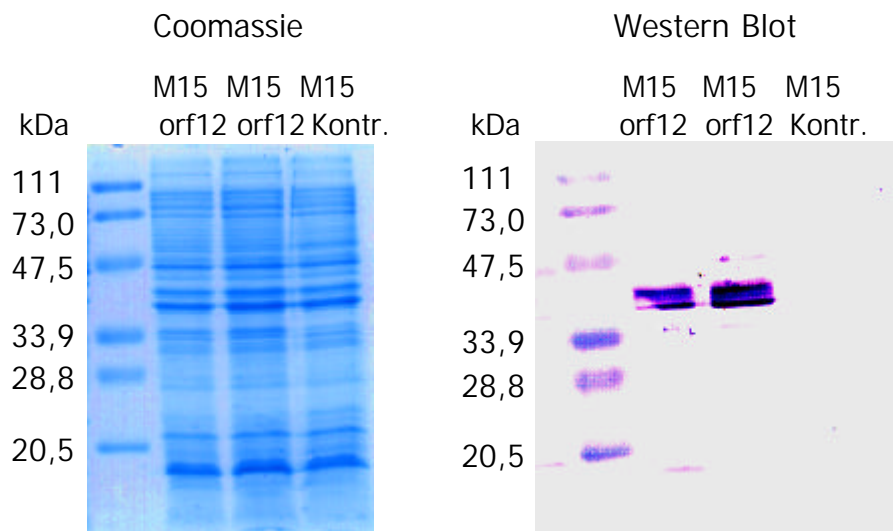


Abb.50: Expression, Reinigung und Detektion von Ub12 in *E. coli* mit Hilfe des QIAexpress Kit (QIAGEN GmbH, Hilden), aus dem Hybridplasmid pORF12. M15 bezeichnet den verwendeten *E. coli* Stamm, eingesetzt wurden sowohl der Stamm mit pORF12 (pORF12) als auch ein Kontroll-Stamm ohne zusätzliches Konstrukt (Kontr.).

Im SDS-PAG (Coomassie) konnte trotz Aufreinigung kein prominentes Genprodukt beobachtet werden. Die Hybridisierung mit einer Sonde gegen den Poly-His-Tag markierte zwei Banden im Bereich von ca. 35-40 kDa im Western Blot.

Diese Expression belegte das Überlesen des *in frame* UGA Codons in *ub12* in *E. coli*.

3.8. Vorkommen und Relevanz von Selen und Selenocystein in *B. japonicum* 110spc4, sowie ihr cotranslationaler Einbau in Proteine

Eine mögliche Erklärung für das Überlesen des TGA Stoppcodons in *ub12* ist der cotranslationale Einbau von Selenocystein, der 21ten proteinogenen Aminosäure (Böck *et al.*, 1991).

Im folgenden sind die Untersuchungen zu der Relevanz des Spurenelementes Selen für *B. japonicum* 110spc4 und dem möglichen Einbau von Selenocystein in das Proteom von *B. japonicum* 110spc4 angeführt.

3.8.1. Identifizierung eines DNA-Bereiches in *B. japonicum* 110spc4 mit Sequenzähnlichkeit mit der Selenocystein-Synthase *selA*

Um Selenocystein in Eubacteria in Proteine Cotranslational integrieren zu können, sind nach derzeitigem Wissen mehrere Genprodukte notwendig (Böck *et al.*, 1991; Gursinsky *et al.*, 2000).

Um DNA-Bereiche im Genom von *B. japonicum* 110spc4 zu identifizieren, die homolog zu den *sel* Genen von *E. coli* sind, wurden mittels PCR DNA-Sonden für die Southern Hybridisierung hergestellt. Die Homologe der Gene von Selenocystein-Synthase (*selA*), dem spezifischen Expressionsfaktor (*selB*) und der Selenophosphat-Synthetase (*selD*) sollten lokalisiert werden.

Vier mit Digoxigenin (DIG) markierte DNA-Sonden wurden konstruiert:

EcselA beinhaltet ein ca. 650 bp langes internes DNA-Fragment von *selA* aus dem Genom von *E. coli* DH5 α (konstruiert durch PCR mit Hilfe der Primer SelAfwY und SelArevY, bei einer *annealing* Temperatur von 55 °C).

EcselAB beinhaltet ein ca. 2850 bp langes DNA-Fragment, mit 1133 bp von *selA* und 1725 bp von *selB* aus dem Genom von *E. coli* DH5 α (konstruiert durch PCR mit Hilfe der Primer SelAfw2 und SelBEcrev, bei einer *annealing* Temperatur von 68 °C).

EcselB beinhaltet ein ca. 850 bp langes internes DNA-Fragment von *selB* aus dem Genom von *E. coli* DH5 α (konstruiert durch PCR mit Hilfe der Primer SelBfwX und SelBEcrev, bei einer *annealing* Temperatur von 69 °C).

EcselD beinhaltet ein ca. 900 bp langes internes DNA-Fragment von *selD* aus dem Genom von *E. coli* DH5 α (konstruiert durch PCR mit Hilfe der Primer SelDEcfw und SelDrev, bei einer *annealing* Temperatur von 65 °C).

Die Southern Blots (Abb.51) bewiesen, daß im Genom von *B. japonicum* 110spc4 ein DNA-Bereich mit Homologe zu *selA* von *E. coli* vorliegt.

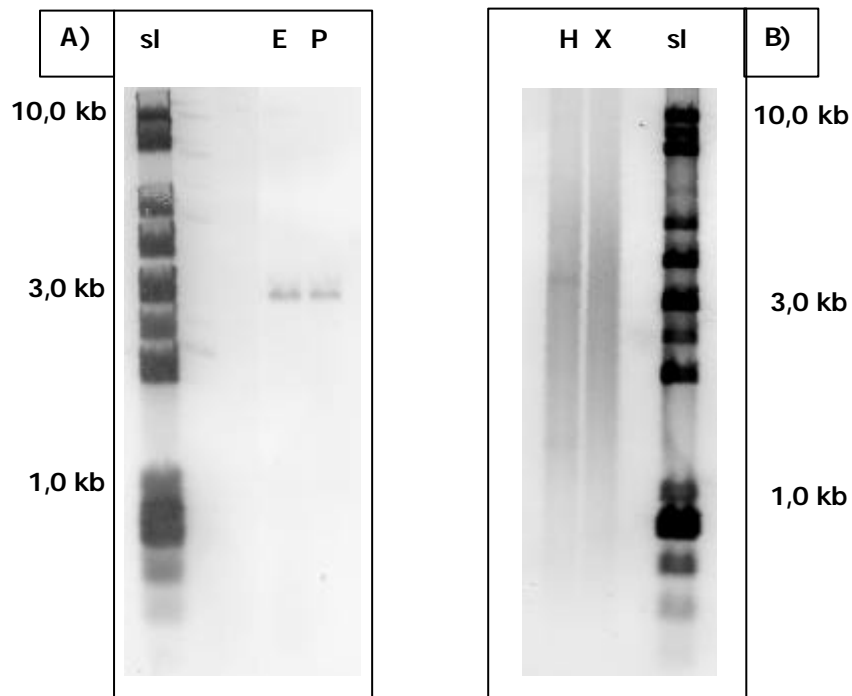


Abb.51: Dokumentation der Southern Blots nach DNA-DNA-Hybridisierung restringierter Gesamt-DNA von *B. japonicum* 110spc4 mit verschiedenen DNA-Sonden. Über den Bahnen des Agarosegels sind die verwendeten Restriktionsendonukleasen angegeben *EcoRI* (E), *PstI* (P) und *XhoI* (X). Als Längenmarker wurde die smart ladder eingesetzt.

A) Hybridisierung mit der Sonde EcselA bei einer annealing Temperatur von 60 °C.

B) Hybridisierung mit der Sonde EcselAB bei einer annealing Temperatur von 53 °C.

EcselA hybridisierte mit einem ca. 3,1 kb großen *EcoRI* DNA-Fragment und einem minimal größeren *PstI* DNA-Fragment von *B. japonicum* 110spc4.

Bei der Hybridisierung mit der Sonde EcselAB wurde in der mit *HindIII* geschnittenen DNA von *B. japonicum* 110spc4 ein ca. 3,4 kb und ein ca. 1,4 kb großes Fragment detektiert.

Mit den Sonde EcselB und EcselD konnte bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden, es wurden jeweils mehrere (je nach Restriktion 4-6) Banden ähnlicher Intensität identifiziert.

3.8.2. Die Unterbrechung des ORFs *sbp* beeinträchtigt die Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow

Stacey und Kollegen sequenzierten das 5'-Ende eines ORFs aus *B. japonicum* USDA 110 (G. Stacey: persönliche Mitteilung), der hohe Ähnlichkeit zu *sbp*, dem Gen eines konservierten Selen bindenden Proteins, aufwies. Sbp wurde bereits in verschiedenen Organismengruppen identifiziert, unter anderem in Pflanzen (wie z.B. *Glycine max*), in Säugetieren (wie z.B. *Rattus norvegicus*) und auch in Archaeobakterien (wie z.B. *Methanococcus* sp.); es wurde allerdings noch nicht für ein Eubakterium publiziert.

Basierend auf dieser vorläufigen Sequenz von *B. japonicum* USDA 110 wurden Primer konstruiert und mit deren Hilfe ein DNA-Fragment aus *B. japonicum* 110*spc4* amplifiziert. Dieses wurde unter Verwendung des TOPO TA Cloning® Kit in pCR®2.1-TOPO® kloniert und sequenziert. Die resultierende 501 bp lange DNA-Sequenz mit der 166 AS langen abgeleiteten AS-Sequenz (Abb.52) bestätigten die angesprochenen Ähnlichkeiten, und das ansequenzierte Gen von *B. japonicum* 110*spc4* wurde von da an als *sbp* bezeichnet.

Über eine Länge von 168 AS (166 AS der Sequenz plus zwei Lücken) konnten zu dem 462 AS langen hypothetischen Selen bindenden Protein von *Sulfolobus tokodaii* 55 % Identität und 67 % Übereinstimmung berechnet werden, dies war die höchste angegebene Ähnlichkeit. Aber selbst zu dem 478 AS langen Selen bindenden Protein Sbp von *Glycine max* bestanden noch 39 % Identität und 53 % Übereinstimmung über eine Länge von 167 AS (164 AS der Sequenz plus drei Lücken), hierbei handelte es sich um die fünfte von der Datenbank des NCBI angegebene Ähnlichkeit. Das Alignment der angesprochenen Sequenzen (Abb.53) verdeutlichte die Ähnlichkeit der potentiellen Genprodukte und ließ somit auf die Funktion von Sbp in *B. japonicum* 110*spc4* schließen.

1	M E A P A E N F A Y T L L L S P D F S K GATGGAAGCACCTGCGGAGAACTTTGCCTATACGTTGCTGCTCAGTCCGGATTTCTCAAA	60
61	P D A L A V I D V K P G S P T Y G Q I V GCCGGATGCTCTTGCGGTCATCGACGTCAAGCCGGGATCGCCGACCTATGGCCAGATCGT	120
121	H T V T M P N K G D E F H H F G W N A C CCACACCGTGACGATGCCCAACAAAGGCGACGAGTTTCATCACTTCGGCTGGAATGCCTG	180
181	S S A L S P L A G H A F I E R R Y L I I CTCTTCCGCTTGTCGCGCTCGCCGGACACGCCTTCATCGAGCGGCGCTATCTCATCAT	240
241	P G L R S S R I Y I I D T K P D P T K A CCCCGGGCTGCGCTCGTCGCGGATCTACATCATCGATACCAAGCCCGATCCGACCAAAGC	300
301	K I H K I I E P E E V F K K T G Y S R P CAAGATCCACAAGATCATCGAACCGGAGGAAGTCTTCAAGAAGACCGGCTACTCGCGCCC	360
361	H T I H C G P D G I Y V S T L G G G G K GCACACCATCCATTGCGGGCCGGACGGCATCTATGTCAGCACGCTGGGCGGCGGGCGCAA	420
421	D G T N G P P G V F I M D C E T F E V L GGACGGCACCAACGGACCTCCGGGCGTCTTCATCATGGATTGCGAGACGTTTCGAGGTCCT	480
481	G R W E I D TGGACGATGGGAGATCGACCG	501

Abb.52: DNA-Sequenz eines 501 bp langen DNA-Fragmentes aus *B. japonicum* 110spc4 sowie die abgeleitete AS-Sequenz (166 AS), angegeben im Einbuchstabencode.

BjSbp:	1	MEAPAENFAYTLLL--SPDFSKPDALAVIDVKPGSPTYGQIVHTVTMPNKGDEFHHFGWN	175
		M+AP E+ AY L ++ D +AV+DV P S TY +IVH V +P DE HHFGWN	
StSbp:	20	MKAPPEDLAYVACLYTGTGINRADFIADVDPNPKSETYSKIVHKVELPYINDELHHFGWN	79
BjSbp:	59	ACSSALSPLAGHAFIERRYLIIPGLRSSRIYIIDTKPDPTKAKIHKIIPEEEVFVKKTGYS	355
		ACSSAL P G IERR+LI+PGLRSSRIYIIDTKP+P + KI K+IEPEEV K +GYS	
StSbp:	80	ACSSALCP-NGKPNIERFLIVPGLRSSRIYIIDTKPNPREPKIIVKIEPEEVKKVSGYS	138
BjSbp:	119	RPHTIHCGPDGIYVSTLXXXXXXXXXXXXXVFIMDCETFEVLGRWEID	499
		R HT+HCGPD IY+S L + ++D +FE LG+WEID	
StSbp:	139	RLHTVHCGPDAIYISAL--GNEEGEGPGGILMLDHYSFEPLGKWEID	183
BjSbp:	1	MEAPAENFAYTLLL--SPDFSKPDALAVIDVKPGSPTYGQIVHTVTMPNKGDEFHHFGWN	58
		M P E Y + KPD LA +DV P SPTY +++H + +P GDE HHFGWN	
GmSbp:	24	MSGPKETLLYVTAIYSGTGRDKPDFLATVDVDPSSPTYSKVIHRLPVYPYLGDELHHFGWN	83
BjSbp:	59	ACSSALSPLAGHAFIERRYLIIPGLRSSRIYIIDTKPDPTKAKIHKIIPEEEVFVKKTGYS	118
		+CSS G RRYLI+P L S RIY++DT+ +P +HK++EPE++ KTG +	
GmSbp:	84	SCSSCY---GDPSAVRRYLILPSLVSGRIYVVDTRSNPRSPSLHKVVEPEDIIISKTGLA	139
BjSbp:	119	RPHTIHCGPDG-IYVSTLXXXXXXXXXXXXXGVFIMDCETFEVLGRWE	164
		HT HC G + +S L F++ F + GRWE	
GmSbp:	140	YAHTSHCLASGDVMISFLGDKDGNAAGSG--FLLLDHEFNLGKWE	183

Abb.53: : Vergleich der AS-Sequenz des potentiellen Genproduktes von *sbp* aus *B. japonicum* 110spc4 (BjSbp) mit dem hypothetischen Selen bindenden Protein von *Sulfolobus tokodaii* (StSbp) bzw. dem Selen bindenden Protein Sbp von *Glycine max* (GmSbp). Ein konservierter Aminosäureaustausch ist durch ein + gekennzeichnet. Horizontale Striche überbrücken Bereiche, in denen nur in einer der AS-Sequenzen zusätzliche AS vorkommen (nach Karlin und Altschul, 1990 und 1993).

Ein 247 bp langes internes DNA-Fragment aus *sbp* wurde als *Sma*I-*Eco*RI-Fragment in den mobilisierbaren Vektor pNVDEmob umklontiert, sodaß der *lacZ* Promotor des Vektors gegenläufig zu der Leserichtung von *sbp* war. Das so konstruierte Hybridplasmid pSEBPΔ wurde für eine Vektorintegrationsmutagenese von *B. japonicum* 110*spc4* eingesetzt. Die Insertion erfolgte über homologe Rekombination und resultierte in der Mutante *B. japonicum sbpΔ-1*. Die korrekte Insertion wurde mittels Southern Blotting verifiziert.

Im Pflanzentest mit *B. japonicum sbpΔ-1* konnte die Relevanz von *sbp* für die Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow belegt werden. Die oberirdischen Pflanzenteile wiesen 28 dpi und auch 35 dpi starke Chlorosen auf. Im Vergleich zu der Symbiose von *Glycine max* bv. Maple Arrow und dem WT *B. japonicum* 110*spc4* zeigten sich 21 dpi keine deutlichen Unterschiede im Wuchs des Wurzelsystems bei der Symbiose mit der Mutante *B. japonicum sbpΔ-1*. Auch die Anzahl der bis zu diesem Zeitpunkt gebildeten Wurzelknöllchen wies keine signifikante Veränderung durch die Mutation von *sbp* auf, die Knöllchen waren allerdings in ihrer Größe eindeutig verringert (Tab.06).

<i>Glycine max</i> bv. Maple Arrow im Pflanzentest 21 dpi	Knöllchenzahl pro Pflanze	Knöllchengröße
<i>B. japonicum</i> 110 <i>spc4</i>	31 ± 13	2,0 mm ± 1,0
<i>B. japonicum sbpΔ-1</i>	29 ± 11	1,5 mm ± 0,5

Tab.06: Dargestellt sind Größe und Anzahl der Knöllchen pro Pflanze, gebildet von *Glycine max* bv. Maple Arrow in der Symbiose mit *B. japonicum* 110*spc4* bzw. *B. japonicum sbpΔ-1* 21 dpi.

Es ist der jeweilige Durchschnittswert aus zwölf Versuchen angegeben, sowie die entsprechende Standardabweichung der Knöllchenzahl.

Die aus der Symbiose von *Glycine max* bv. Maple Arrow mit *B. japonicum sbpΔ-1* resultierenden Wurzelknöllchen waren in ihrer stark Stickstoff-Fixierung reduziert, im Vergleich zu den aus der Symbiose mit *B. japonicum* 110*spc4* resultierenden Wurzelknöllchen (Abb.54). Es konnte nur eine durchschnittliche Nitrogenaseaktivität von 2,2 nmol Ethen·mg KFG⁻¹·h⁻¹ gemessen werden, was etwa 12 % der Fixierungsleistung des WT entsprach.

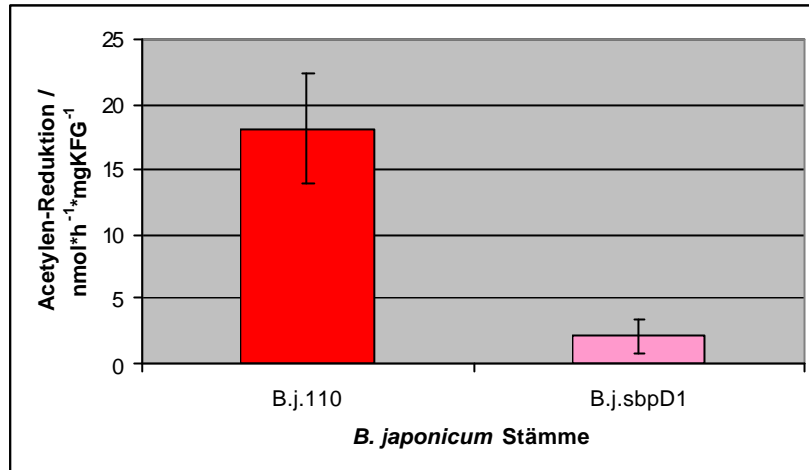
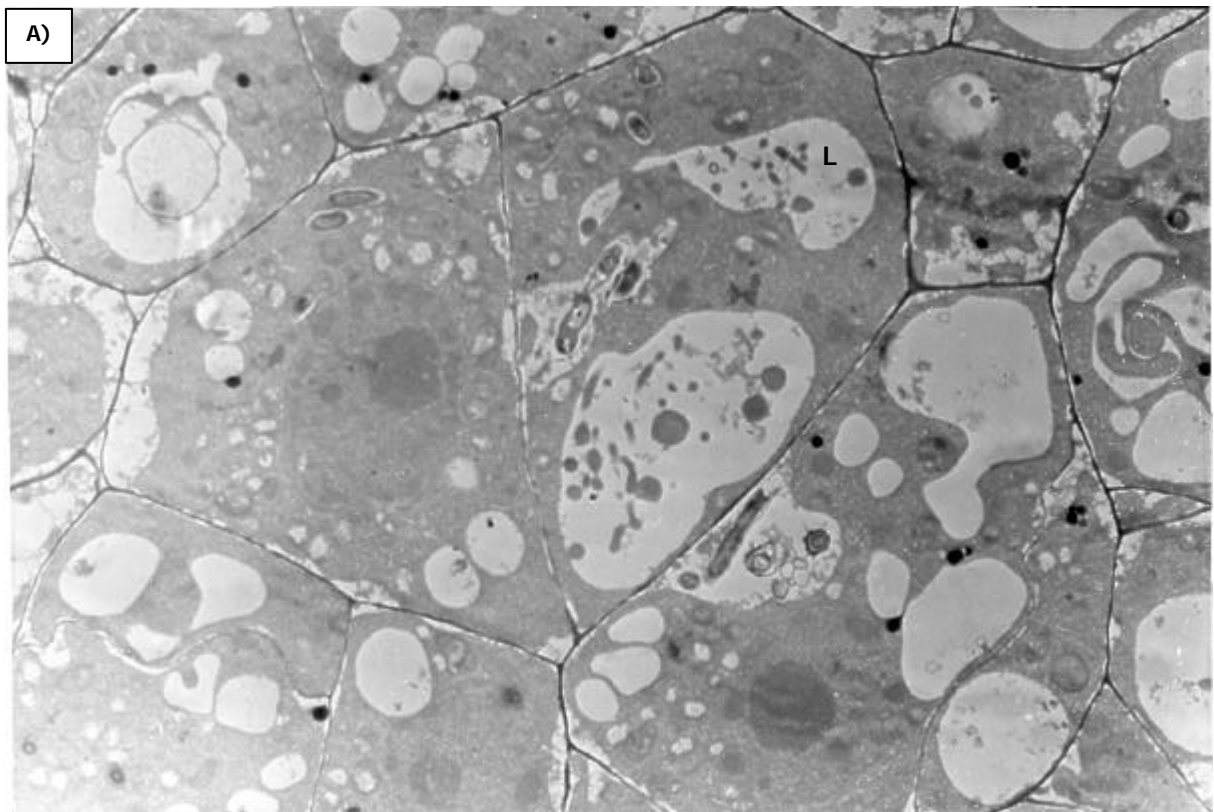


Abb.54: Graphische Darstellung der Fixierungsleistung der Knöllchen von *Glycine max* bv. Maple Arrow, 21 dpi mit *B. japonicum* 110spc4 (B.j.110) bzw. *B. japonicum* spb Δ -1 (B.j.sbpD1).

Die Stickstoff-Fixierungsleistung ist in $\text{nmol Ethen} \cdot \text{mg KFG}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ angegeben.

Die elektronenmikroskopische Analyse des inneren Gewebes der Wurzelknöllchen zeigte die starken Auswirkungen der Mutation in *B. japonicum* spb Δ -1 auf die symbiotische Interaktion mit *Glycine max* bv. Maple Arrow (Abb.55).



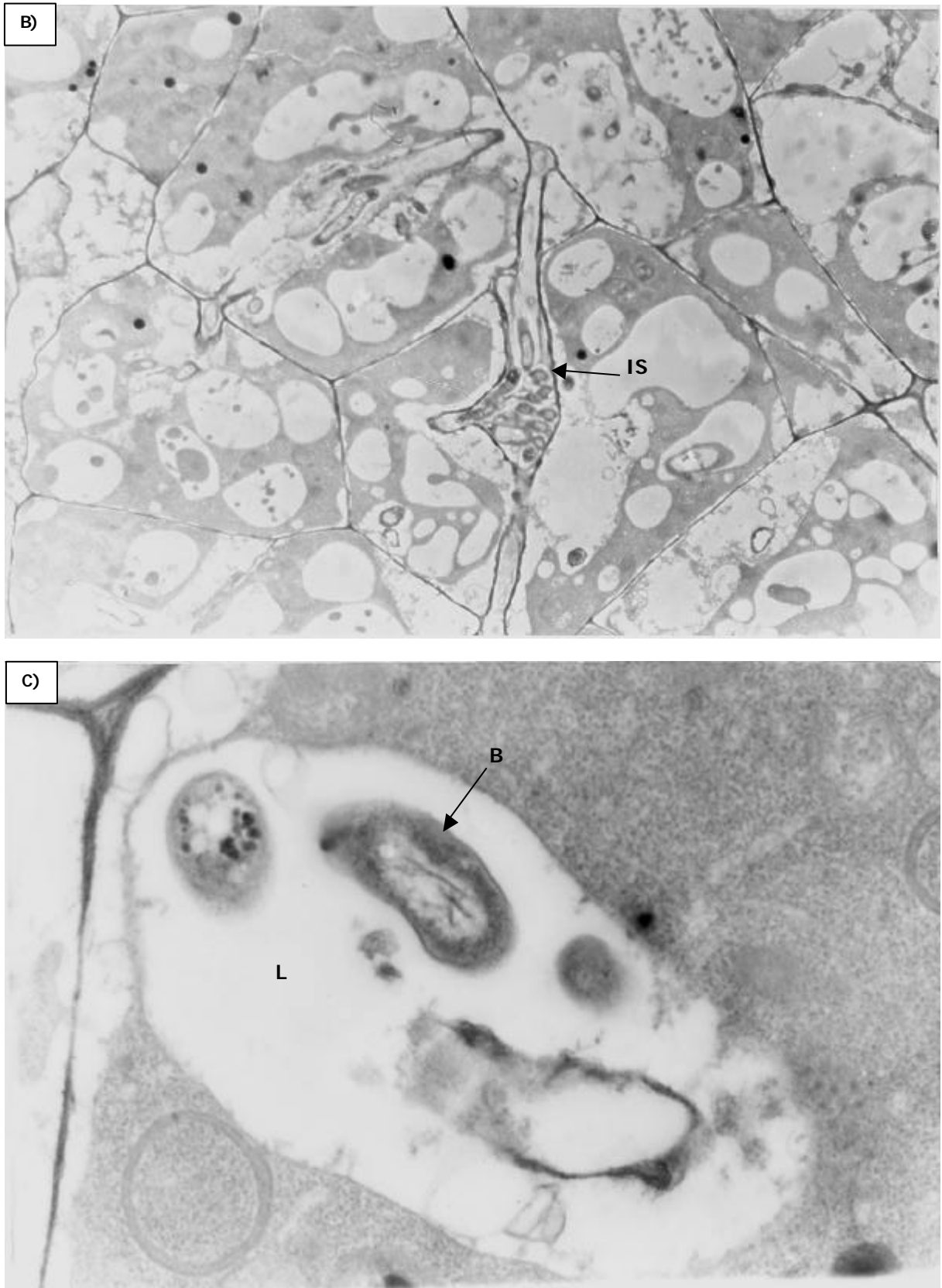


Abb.55: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten des inneren Gewebes von Wurzelknöllchen aus der Symbiose von *B. japonicum* sbp Δ -1 mit *Glycine max* bv. Maple Arrow 21dpi. In den Aufnahmen wurden besonders beispielhafte Strukturen markiert: potentielle Lysosomen (L), Infektionsschläuche (IS), und Bakterioide (B). Vergrößerung: 3480x (A); 5410x (B); 34780x (C)

Die Pflanzenzellen des infizierten Gewebes der Wurzelknöllchen waren relativ gleichmäßig ausgebildet, es waren keine Ansammlungen von infizierten bzw. von nicht-infizierten Zellen zu beobachten. Die Zellen waren nur schwach infiziert, enthielten allerdings ein stark ausgebreitetes Vakuom, das vorzugsweise um den Zellkern herum lokalisiert war.

Die in den Infektionsschläuchen enthaltenen Bakterien schienen durch die Mutation nicht beeinflusst, weder in Zahl noch in Aussehen (Abb.55B).

Die Symbiosomen dagegen entsprachen in ihrer Erscheinung keineswegs dem WT. Die PBM war in den meisten Fällen deutlich vergrößert, es konnten außerdem mehrfach Lysosomen beobachtet werden, in denen Bakterioide von der Pflanzenzelle verdaut wurden. Es handelte sich meistens um relativ große Lysosomen mit mehreren Bakteroiden und deren Auflösungsprodukten. So zeigt Abb.55C beispielsweise ein Lysosom, das zwei noch relativ intakte Bakterioide enthielt, sowie eines, das sich gerade in der Auflösung befand. Es konnte in der Vielzahl untersuchter Pflanzenzellen nur eine sehr geringe Anzahl intakt erscheinender Symbiosomen identifiziert werden.

Darüberhinaus wurde beobachtet, daß die Pflanzenzellen des inneren Knöllchengewebes fast keine Stärkekörner enthielten, lediglich in den nicht infizierten Zellen der Rinde konnten größere Einschlüsse von Stärke ausgemacht werden.

3.8.3. Potentielle stem-loop Strukturen in der mRNA von *ub12*

Für den cotranslationalen Einbau von Selenocystein an der Position eines UGA Codons wird in allen bisher beschriebenen Systemen eine stem-loop Struktur der mRNA benötigt (Hüttenhofer *et al.*, 1998), bei Eubacteria ist dieses cis-Element direkt downstream des UGA lokalisiert. In *ub12* konnte eine potentielle stem-loop Struktur downstream des UGA identifiziert werden, sie stimmt in ca. 50 % der Basen mit bekannten Strukturen von *fdhF* und *fdnG* aus *E. coli* überein, in der Basen-Sequenz des loop sogar in 67 % (Abb.56).

```

E. c. fdhF:      UGAACGGCCCAUCGGUGCAGGUCUGCACCAAUCGGUCGGU
B. j. ub12:      UGAUCGACGGCGCCGUGCGCGCCAGCUUGGUGCUUCAAGACCUCGGUCGACU
E. c. fdnG:      UGAACGGACCAACGGUAGCAAGUCUUGCUCCAACAUUUGGUCGCGGU
  
```

Abb.56: Alignment der abgeleiteten mRNA Sequenz des UGA Codons aus *ub12* von *B. japonicum* 110spc4 und des downstream lokalisierten Bereiches (*B.j.ub12*) mit mRNA Regionen von *fdhF* (*E.c.fdhF*) und *fdnG* (*E.c.fdnG*) aus *E. coli*, die in einem cotranslationalen Einbau Selenocystein in das Genprodukt resultieren. Das UGA ist rot und die downstream übereinstimmenden Basen sind blau/fett hervorgehoben. Die Basen des potentiellen loop sind unterstrichen.

Die gefaltete stem-loop Struktur ist in Abb.57 dargestellt, im Vergleich mit entsprechenden cis-Elementen aus *E. coli*. Die für *ub12* berechnete Bindeenergie (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/>) war mit $-12,0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ unter physiologischen Bedingungen (bei 28°C) schwächer als diejenige, die für die zum Vergleich herangezogenen *E. coli* Gene publiziert wurde, sie lag bei $15,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ in *fdnG* (Berg *et al.*, 1991) bzw. $17,6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ in *fdhF* (Zinoni *et al.*, 1990).

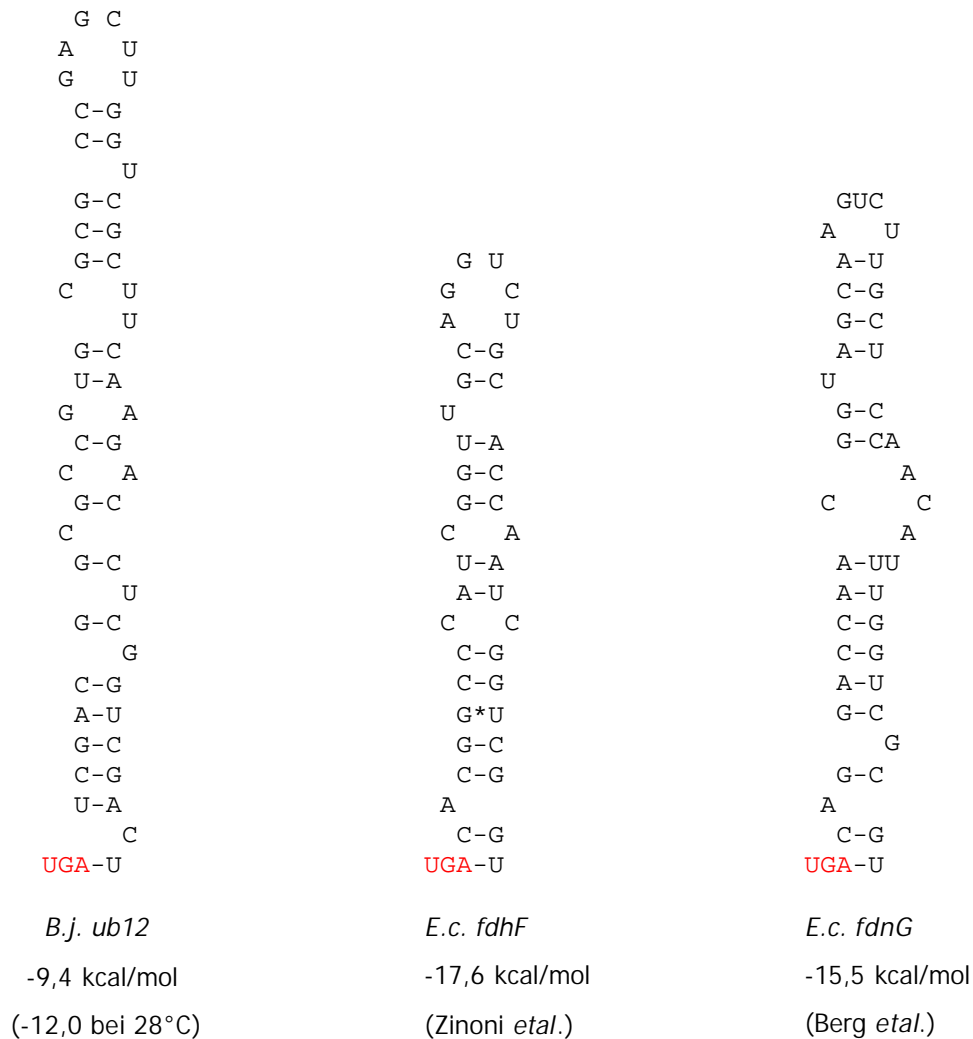


Abb.57: Graphische Darstellung der potentiellen mRNA stem-loop Struktur aus *ub12* in *B. japonicum* 110spc4 (*B.j.ub12*) im Vergleich mit bekannten Strukturen aus *E. coli* (*E.c.fdhF* bzw. *E.c.fdnG*). Für *ub12* ist die Bindeenergie der Struktur angegeben, die mit Hilfe der Computerprogramme mfold2.3 und mfold3.0 berechnet wurde, die durch Zuker und Turner im Internet zur Verfügung gestellt werden: <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/>

Ein Vergleich der minimalen Selenocystein Insertions Sequenz (SECIS) aus *ub12* mit denen von *fdhF* und *fdnG* aus *E. coli* zeigten noch klarere Übereinstimmungen (Abb.58). Unterschiede waren die Distanz zu dem UGA Codon, die mit 16 bp deutlich größer war als

A)

G U	G C	GUC
G C	A U	A U
A U	G U	A-U
C-G	C-G	C-G
G-C	C-G	G-C
U	U	A-U
U-A	G-C	U
G-C	C-G	G-C
13G-C	17G-C	13G-C

E.c.fdhF *B.j. ub12* *E.c.fdnG*

B)

Diagram B shows three RNA secondary structure models for the genes *fdhF*, *ub12*, and *fdnG*. Each model displays the 5' to 3' sequence and highlights specific base pairs (red and blue) that are critical for the structure. The *fdhF* model shows a large loop at the 5' end and a stem-loop at the 3' end. The *ub12* model shows a large loop at the 5' end and a stem-loop at the 3' end. The *fdnG* model shows a large loop at the 5' end and a stem-loop at the 3' end. The diagrams are labeled with their respective genes and the change in Gibbs free energy (ΔG) for the initial and final states.

fdhF: $\Delta G = -4.9$ [Initially -4.9]

ub12: $\Delta G = -4.8$ [Initially -4.8]

fdnG: $\Delta G = -4.2$ [Initially -4.2]

A) Graphische Darstellung der stem loop Strukturen nach den Literaturvorgaben, die Zahl an der ersten Base gibt die relative Position zu dem *in frame* UGA Codon an.

B) Berechnung der energetisch besten Struktur, basierend auf der mRNA Sequenz.

Damit erfüllte die downstream des abgeleiteten UGA Codons gelegene Sequenz in *ub12* verschiedene Voraussetzungen, die für einen cotranslationalen Einbau von Selenocystein in ein Genprodukt in *E. coli* beschrieben wurden.

3.8.4. Der Versuch des cotranslationalen [^{75}Se]-Einbaus in Ub12 in *E. coli*

Das in *E. coli* M15 produzierte Genprodukt (3.7.3.) bewies, daß eine Expression von Ub12 in *E. coli* unter bestimmten Bedingungen möglich war. Um den Einbau von Selenocystein in das Genprodukt zu belegen, sollte die Inkorporation des radioaktiven Selen Isotopes ^{75}Se über [^{75}Se]-Selenit dokumentiert werden.

Die exakten Versuchsbedingungen, wie sie in den in 3.7.3. beschriebenen Expressionsstudien angelegt wurden, konnten in dieser Versuchsreihe nicht wiederholt werden, da die eingesetzte Methodik dies nicht zuließ. Die Hybridplasmide wurden in *E. coli* DH5 α getestet und die Inkubation mit dem radioaktiven Isotop [^{75}Se] erfolgte nur für maximal 2 h. Darüberhinaus wurden die Bakterienkulturen in LB-Medium angezogen und die Induktion des *lacZ* Promotors erfolgte durch die Zugabe von IPTG, ohne exakte Kontrolle mittels des Repressors.

Für das Konstrukt pORF12 wurde ein Expressionsprodukt von ca. 33 kDa erwartet, wie es in Abb.50 in 3.7.3. gezeigt werden konnte. Das erwartete Gewicht des potentiellen Expressionsproduktes von pfr2U2 lag, aufgrund der Länge von 194 AS, bei ca. 20 kDa.

Das Hybridplasmid pORF12 Δ S13 und der Vektor pUC18 waren jeweils die Negativkontrollen, da sie kein TGA Codon mit anschließendem cis-Element beinhalten, das einen Selenocystein-Einbau verursachen könnte.

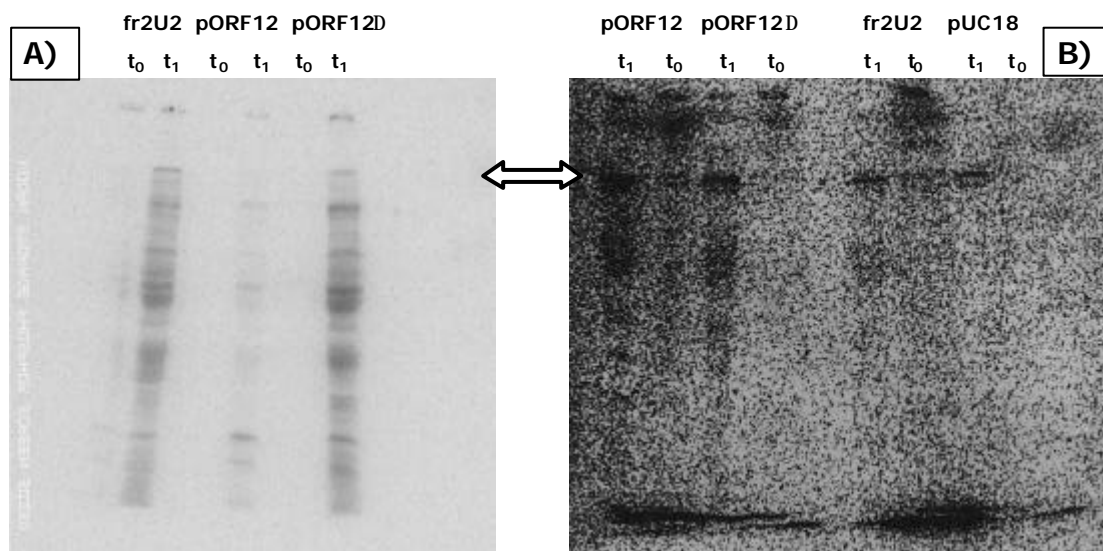


Abb.59: Autoradiographische Auswertung von in SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennten Proteinen aus *E. coli* DH5 α mit verschiedenen Hybridplasmiden, nach Inkubation mit [^{75}Se]-Selenit. Die Zellen wurden jeweils zu zwei Zeitpunkten geerntet, einerseits 5 min nach der Zugabe des [^{75}Se]-Selenit (t₀) und andererseits ca. 1,5-2 h nach der Zugabe des [^{75}Se]-Selenit (t₁). Ernte nach Anzucht in LB-Medium ohne (A) und mit Cystein (100 mg·l⁻¹). Die Position des Selenoproteins FDH-O (110 kDa) ist durch einen Pfeil markiert. pORF12 Δ bezeichnet das Konstrukt pORF12 Δ S133

Selbst bei Wachstum in Vollmedium (LB) fand in *E. coli* ein unspezifischer Einbau des Selens in die Proteine statt, dies zeigte sich im ersten Versuchsansatz deutlich (Abb.59A). Bei der unspezifischen Inkorporation wird Selen, das in der Natur ubiquitär als Verunreinigung des Schwefels vorkommt, statistisch verteilt an Stelle des Schwefels in die proteinogenen AS eingebaut (Cowie *et al.*, 1957; Tuve *et al.*, 1961). Damit war eine Auswertung dieser Versuchsreihe bezüglich der Expression von Ub12 in *E. coli* nicht möglich.

Durch die Zugabe von Cystein zum Medium (in einer Konzentration von $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) konnte in der zweiten Versuchsreihe (Abb.59B) der unspezifische Einbau von Selen in die Proteine von *E. coli* unterdrückt werden (Müller *et al.*, 1997). Damit verblieb unter diesen Versuchsbedingungen das 110 kDa große Selenoprotein FDH-O als Positivkontrolle sichtbar; bei der Formate Dehydrogenase O (FDH-O) handelt es sich um das einzige Selenoprotein in *E. coli*, das unter aeroben Bedingungen produziert wird (Sawers *et al.*, 1991). Dies bestätigte, daß ein spezifischer Einbau des Selens in die Proteine von *E. coli* DH5 α unter den gegebenen Versuchsbedingungen stattfand. Allerdings konnte auch nach mehrtätiger Inkubation des getrockneten SDS-PAG auf der Phosphoimager Platte keine weitere spezifische Bande detektiert werden, die auf den Einbau von [^{75}Se] in Ub12 hindeuten würde (Abb.59B).

3.8.5. Inkorporation von [^{75}Se] in das Proteom von *B. japonicum* 110spc4

Die Anzucht von *B. japonicum* in Vollmedium, das mit [^{75}Se]-Selenit angereichert wurde, sollte Aufschluß über das Vorkommen von Selenoproteinen in *B. japonicum* 110spc4 geben. Es wurden mehrere Ansätze unter verschiedenen Versuchsbedingungen durchgeführt, dabei kam es aber in allen Fällen zu einer unspezifischen Inkorporation von [^{75}Se] in das Proteom der *B. japonicum* Stämme 110spc4 und 2-10.

Um die Markierung durch [^{75}Se] zu optimieren, wurde in den ersten Versuchsreihen die Anzucht in den definierten Medien 20H-Se1 und 20N-Se2 durchgeführt, in denen die Konzentrationen von Schwefel und Selen minimiert sind. Dies sollte die Menge der nicht-radioaktiven Selenmoleküle minimieren und damit den Einbau von [^{75}Se] maximieren. In den Proteinen, die aus diesen Bakterien-Anzuchten gewonnen wurden, war ein unspezifischer Einbau des radioaktiven Isotopes [^{75}Se] zu beobachten. Die Intensität der Banden in dem Coomassie gefärbten SDS-PAG entsprach der Intensität derselben Banden auf dem Autoradiogramm.

Die Anzucht in Vollmedium (20E) konnte keine Verbesserung der Markierung bewirken, die Inkorporation des [^{75}Se] war auch unter diesen Bedingungen unspezifisch.

Die in *E. coli* beobachtete Unterdrückung des unspezifischen Einbaus von Selen, durch die Zugabe von Cystein (3.8.4.), konnte in *B. japonicum* nicht erreicht werden. Mit Hilfe einer Anzuchtreihe bei 28 °C unter aeroben Bedingungen konnte gezeigt werden, daß die Zugabe von Cystein und Methionin (die beiden Schwefel enthaltenden proteinogenen AS) zum Medium (20E) bis zu einer Konzentration von 350 mg·l⁻¹ keine signifikanten negativen Auswirkungen auf das Wachstum von *B. japonicum* 110spc4 und *B. japonicum* 2-10 hatten. Höhere Konzentrationen von Cystein und Methionin führten zu einer Verlangsamung des Wachstums (Daten nicht abgebildet).

Basierend auf diesen Beobachtungen erfolgte die Anzucht in der abschließenden Versuchsreihe bei 28 °C unter aeroben Bedingungen in Vollmedium (20E), angereichert mit Cystein und Methionin in einer Konzentration von jeweils 300 mg·l⁻¹. Die in Abb.60 dargestellte Auswertung mittels SDS-PAGE und Autoradiogramm zeigte, daß unter den gegebenen Bedingungen keine Unterdrückung des unspezifischen Einbaus von Selen in die Proteine von *B. japonicum* 110spc4 und *B. japonicum* 2-10 erfolgte.

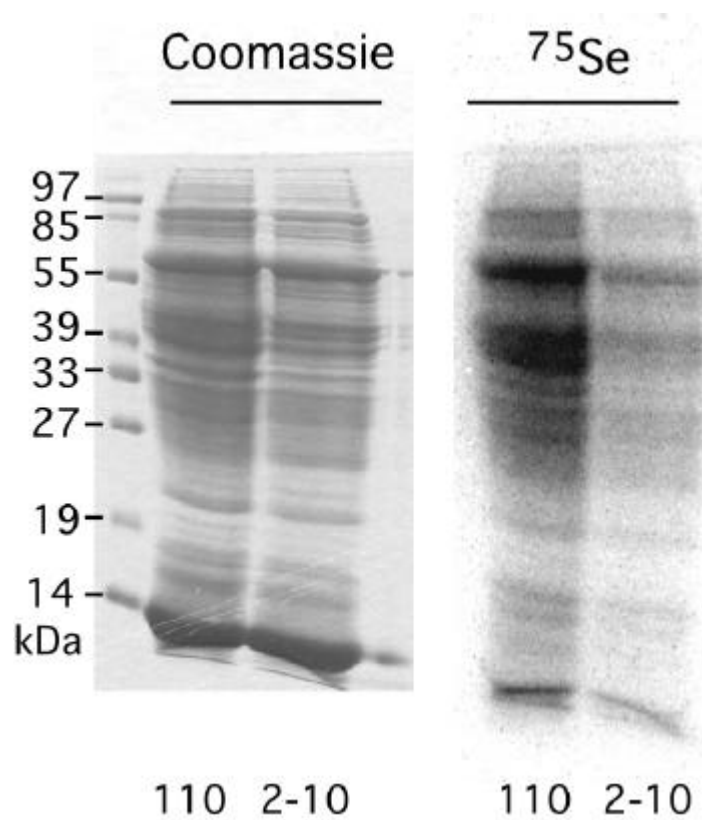


Abb.60: Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine von *B. japonicum* 110spc4 (110) und *B. japonicum* 2-10 (2-10) im SDS-PAG (Coomassie) und anschließende Autoradiographie (^{75}Se), nach Anzucht in Vollmedium (20E) angereichert mit Cystein und Methionin in einer Konzentration von jeweils 300 mg·l⁻¹.

Aufgrund der Tatsache, daß *ub12* relevant für die Ausbildung der Symbiose von *B. japonicum* 110*spc4* mit *Glycine max* bv. Maple Arrow war, wurde die Anzucht der Bakterien unter dem Einfluß von [⁷⁵Se]-Selenit parallel unter mikroaeroben Bedingungen durchgeführt. Aber auch die Proteine, die aus den unter diesen Bedingungen angezogenen Bakterien isoliert und analysiert wurden, waren unspezifisch mit [⁷⁵Se] markiert (Daten nicht abgebildet).

3.9. Reporterfusionen belegen das Überlesen des UGA Codons in *E. coli*, in Abhängigkeit vom downstream Bereich der mRNA

Die in 3.7.2. dargestellten Reporterfusionen zeigten, daß evtl. ein Überlesen des UGA Codons der mRNA von *B. japonicum* 110*spc4* in *E. coli* direkt detektiert werden kann. Die Expression war allerdings so gering, daß eine weitere Unterscheidung unter Verwendung des ONPG-Tests nach Miller (1972) aufgrund der zu geringen Sensitivität des Meßsystems nicht möglich war.

Die Anzucht der *E. coli* Klone auf X-Gal haltigen Vollmedium-Agarplatten lieferte den nötigen Hinweis zur Veränderung des Testsystems. Wenn die Kulturen nach ü.N. Inkubation bei 37 °C anschließend für einige Tage bei RT gelagert wurden, zeigten sich auch bei Klonen, die im ONPG-Test keine Aktivität aufwiesen, eindeutige Farbänderungen. Die entstehende Blaufärbung der verschiedenen Klone war unterschiedlich stark und die Unterschiede waren reproduzierbar.

Um die Expression der translationalen Reporterfusionen mit *lacZ* zu vergleichen, wurde daraufhin die Aktivität der β -Galactosidase in Flüssigkultur *in vivo* durch die Umsetzung von X-Gal photometrisch gemessen (2.5.2.). Auf diesem Weg konnte die Expression über einen längeren Zeitraum beobachtet werden und damit war es möglich geringere β -Galactosidase Aktivitäten zu messen und geringere Abweichungen zu unterscheiden.

3.9.1. Konstruktion translationaler *lacZ*-Reporterfusionen mittels PCR

Basierend auf dem Hybridplasmid pfr2U2 wurden mittels PCR weitere translationale Reporterfusionen konstruiert, wobei das gesamte Hybridplasmid amplifiziert wurde, mit Modifikationen, die durch die verwendeten Primer spezifiziert wurden (Abb.62). Die resultierenden Hybridplasmide wurden durch Sequenzierung kontrolliert.

Mit dem Primerpaar 2U2ATGfw und 2U2ATGrev wurde das Hybridplasmid pfr2U2 amplifiziert, wobei ein Basenaustausch durchgeführt wurde, der das potentielle Startcodon ATG (bp 3200-3202 der in 3.4.4. angegeben DNA-Sequenz) in ein CTG Codon (codiert Lysin) umwandelte. Ansonsten wurde die DNA-Sequenz des *B. japonicum* 110spc4 Fragmentes sowie des Vektors exakt beibehalten. Es wurde so das Hybridplasmid pATG-8 konstruiert, das außer dem TGA Codon auch 188 bp der downstream Region von *ub12* aus *B. japonicum* 110spc4 trägt.

Ergänzend konnte das Hybridplasmid pATG-1 kloniert werden, das wie pATG-8 den geplanten Basenaustausch zur Aufhebung des potentiellen Translationsstartes beinhaltet (s.o.). Zusätzlich waren aber im Bereich der potentiellen stem-loop Struktur vier Basenaustausche aufgetreten (Abb.61). Diese Mutation führte darüberhinaus nicht zu einer Veränderung des Leserrahmens, aber die Ähnlichkeit zu den minimalen SECIS Elementen der mRNA-Sequenzen von *E. coli* wurde dadurch verringert.

```
pATG-8      UGAUCGACGGCGCCGU--GCGCGCCGAGCUUGGUCGCUUCAAGACCUCGGUCGAC
pATG-1      UGAUCGACGGCGCCGUGUGCGCG-CG-GCUUGGUCGCUUCAAGACCUCGGUCGAC
```

Abb.61: Darstellung des Bereiches der potentiellen stem-loop Region in der mRNA von *ub12* und den entsprechenden RGF-Konstrukten (pATG-8) im Vergleich zu der entsprechenden Sequenz in pATG-1.

Das UGA Codon ist durch Fettdruck hervorgehoben. Eine Stelle, an der nur in der anderen Sequenz eine Base vorkommt, ist durch ein – gekennzeichnet. Die minimale SECIS ist einfach unterstrichen, die potentielle loop Region doppelt.

Eine aus den Hybridplasmiden pATG-8 und pATG-1 resultierende aktive β -Galactosidase mußte demnach auf einem Überlesen des UGA Codons beruhen.

Unter Verwendung des Primerpaares RGF Δ fw und RGF Δ rev wurde das Hybridplasmid p Δ FR20 konstruiert, bei dem 167 bp der downstream Region, über eine durch den Primer RGF Δ rev zusätzlich eingefügte *HindIII* Schnittstelle, deletiert worden war. Der downstream des TGA Codons befindliche DNA-Bereich war damit bis auf 20 bp deletiert (bis bp 3132 der in 3.4.4. angegeben DNA-Sequenz). Das DNA-Fragment, das aus dem Genom *B. japonicum* stammte war somit noch 117 bp lang.

Eine aus diesem Hybridplasmid resultierende aktive β -Galactosidase mußte demnach auf einem Überlesen des UGA Codons beruhen, das unabhängig von einem downstream lokalisierten cis-Element verlief.

Mit Hilfe des Primerpaares 2U2TGAfw und 2U2TGAreV wurden mehrere Hybridplasmide konstruiert, in denen das TGA Codon (bp 3110-3112 der in 3.4.4. angegeben DNA-Sequenz) durch einen Basenaustausch in ein CGA Codon (codiert Arginin) umgewandelt bzw. durch eine Deletion mehrerer bp entfernt wurde.

In dem Hybridplasmid pTGA-32 wurden 24 bp vor dem CGA Codon deletiert (bp 3088-3111 der in 3.4.4. angegeben DNA-Sequenz), damit war ein Überlesen eines TGA Codons in der Expression des Reportergenkonstruktes nicht mehr nötig. Der *lacZ* Start war *in frame* mit dem *lacZa* Fragment, wie auch das potentielle Startcodon innerhalb der *B. japonicum* 110spc4 Sequenz.

Dieses Hybridplasmid diente als Kontrolle und konnte zeigen, daß das Vorhandensein des zusätzlichen DNA-Fragmentes aus *B. japonicum* 110spc4 keine Auswirkungen auf die Expression der β -Galactosidase hatte.

In dem Hybridplasmid pTGA-1 waren dagegen nur 23 bp deletiert (bp 3089-3111 der in 3.4.4. angegeben DNA-Sequenz). Dies resultierte in einer Veränderung des Leserahmens, sodaß das *lacZ* Startcodon nicht mehr *in frame* mit dem downstream gelegenen *lacZa* Fragment war.

Die gemessene β -Galactosidase Aktivität mußte daher auf einem Translationsstart an dem ATG (bp 3200-3202 der in 3.4.4. angegeben DNA-Sequenz) des DNA-Fragmentes von *B. japonicum* 110spc4 beruhen.

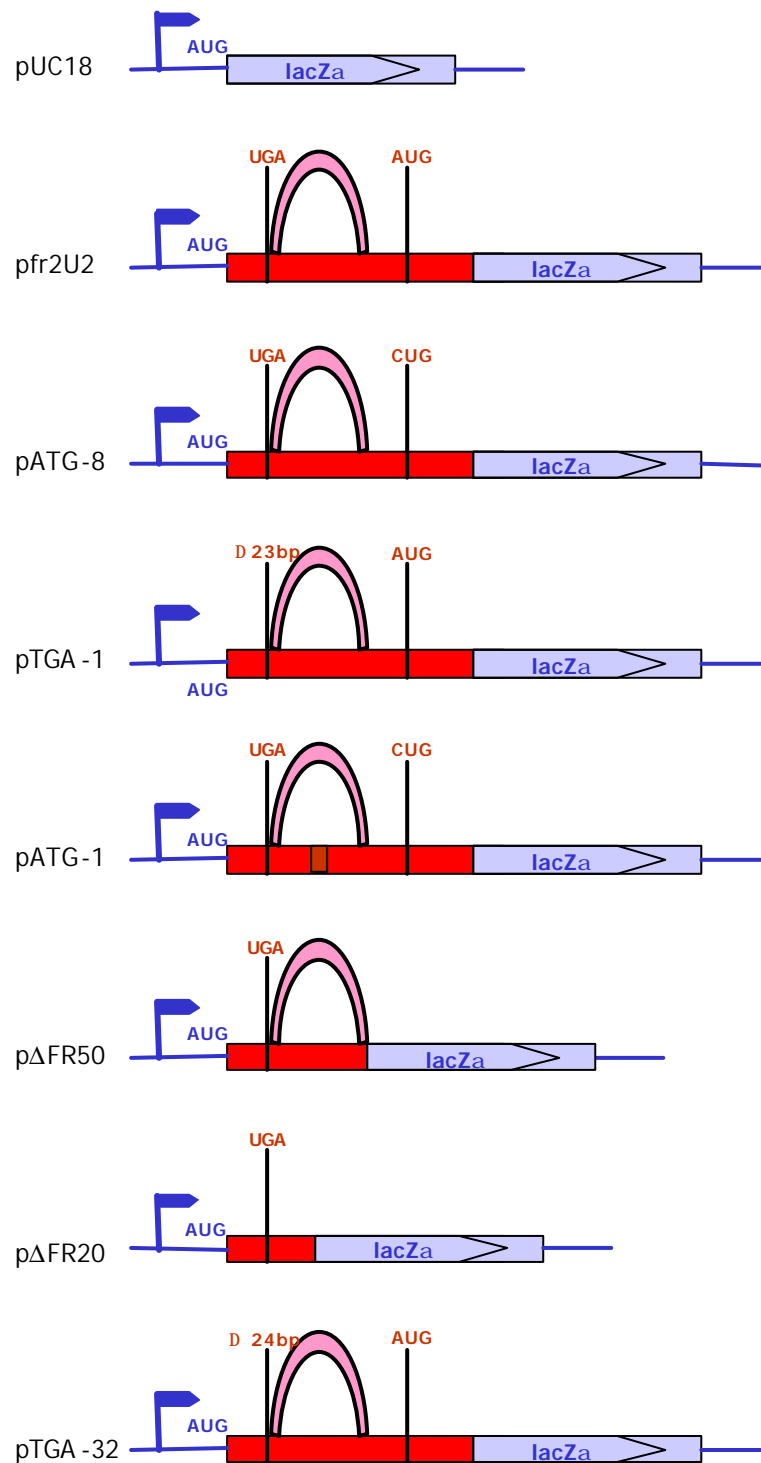


Abb.62: Graphische Darstellung der DNA-Sequenz der Reportergenkonstrukte, basierend auf dem Vektor pUC18 (dargestellt in blau) mit einem DNA-Fragment aus *B. japonicum* 110spc4 (dargestellt in rot), spezifisch verändert durch PCR.

Der lacZ Promotor ist durch einen Pfeil symbolisiert und der Bogen begrenzt den Bereich, der die potentielle stem-loop Struktur auf der mRNA Ebene beinhaltet. Die relevanten Codone der abgeleiteten mRNA-Sequenz sind lokalisiert und Veränderungen der Sequenz sind hervorgehoben.

3.9.2. Die Expression einer funktionellen β -Galactosidase in *E. coli* ATG-8

Der Stamm, der den Nachweis für das Überlesen des UGA Codons aus *B. japonicum* 110*spc4* in *E. coli* lieferte, war *E. coli* ATG-8, basierend auf *E. coli* DH5 α , in den das Hybridplasmid pATG-8 mittels Transformation gebracht wurde. Das Hybridplasmid pATG-8 entspricht dem WT Fragment aus *B. japonicum* 110*spc4*, in dem mittels eines Basenaustausches das zusätzliche potentielle Startcodon ATG in ein Lysin codierendes CTG umgewandelt wurde (Abb.62).

Darüberhinaus diente in dieser Versuchsreihe der Klon *E. coli* Δ FR20, ebenso basierend auf *E. coli* DH5 α , als Kontrolle. In p Δ FR20 war der downstream des TGA gelegene DNA-Bereich aus *B. japonicum* 110*spc4* bis auf 20 bp deletiert (Abb.62).

Referenz war der Stamm *E. coli* DH5 α ohne ein zusätzliches Plasmid.

Bei unterschiedlich durchgeführten Testansätzen konnte unter keinen Bedingungen eine Unterscheidung zwischen diesen Klonen mit Hilfe des ONPG-Testes nach Miller erreicht werden. Daher wurde die Messung der aktiven β -Galactosidase in den Kulturen *in vivo* über einen Zeitraum von 15 d durchgeführt (beschrieben in 2.25.2.). Der erhaltene Wert wurde mit U_x bezeichnet (Abb.63).

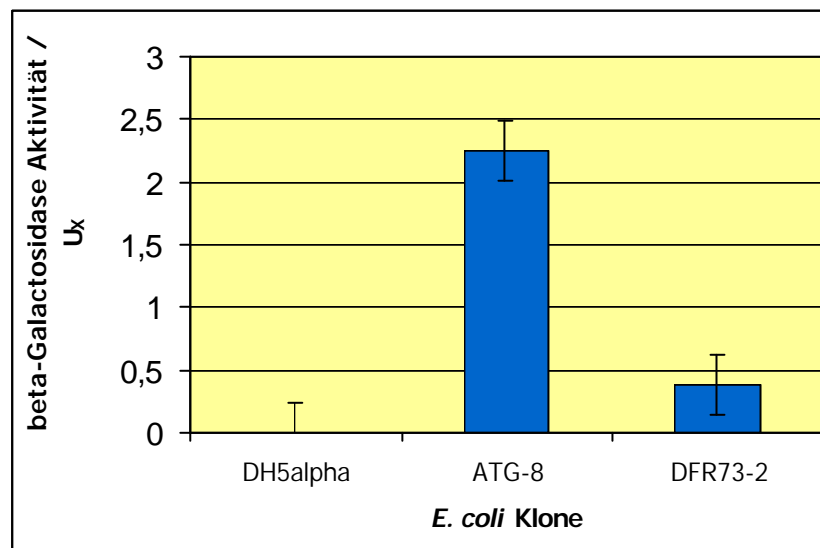


Abb.63: Graphische Darstellung der β -Galactosidase Aktivität der *E. coli* Stämme ATG-8 (ATG-8) und Δ FR20 (DFR20), basierend auf *E. coli* DH5 α , sowie *E. coli* DH5 α (DH5alpha) selbst. Die Werte wurden durch den in 2.25.2. beschriebenen *in vivo* Test gemessen, wobei die Anzucht der Bakterien in PA-Medium erfolgte. Die Aktivität ist in der relativen Einheit U_x dargestellt.

Angegeben sind die Mittelwerte aus vier gleichartig durchgeführten Testreihen. Die Standardabweichung ist durch senkrechte Striche dargestellt.

Die β -Galactosidase Aktivität in *E. coli* ATG-8 war gering aber deutlich meßbar, sie lag bei durchschnittlich 2,26 U_x. In *E. coli* Δ FR20 dagegen, in dessen Konstrukt keine potentielle stem-loop Struktur auf das TGA Codon folgte, die Ähnlichkeit zu den SECIS Elementen von *E. coli* hatte, konnte unter den gleichen Bedingungen keine eindeutige β -Galactosidase Aktivität nachgewiesen werden. Der durchschnittliche Wert lag bei 0,39 U_x mit einer Standardabweichung von 0,22 und damit in dem gleichen Bereich wie der Referenzwert, resultierend aus DH5 α , der 0 U_x bei einer Standardabweichung von 0,24 betrug.

Die Messung der β -Galactosidase Aktivität erbrachte den Nachweis, daß in *E. coli* DH5 α das TGA Codon aus *B. japonicum* 110*spc4* überlesen wurde, wenn die downstream gelegene DNA-Sequenz in ausreichender Länge (in diesem Fall 178 bp) vorhanden war

3.9.3. Messung der β -Galactosidase Aktivität der RGF Klone in *E. coli*

Als Referenz für eine Darstellung in Einheiten, die vergleichbar denen aus dem ONPG-Test sind, wurden pUC18 tragende *E. coli* DH5 α Kulturen wie in 2.25.2. beschrieben angezogen, allerdings ohne die Zugabe von X-Gal. Das Substrat X-Gal wurde erst nach Vollendung der Inkubationszeit zugegeben und die Kulturen wurden für weitere 5,5 h bei RT inkubiert, bis eine deutliche Blaufärbung eintrat. Der daraus berechnete Wert für eine Umsetzung innerhalb des gesamten Inkubationszeitraumes (14d bei RT) lag bei durchschnittlich 280,71 U_x.

Damit entsprach der für pfr2U2 gemessene Wert mit 27,30 U_x ungefähr 10 % dessen von pUC18. Diese Relation bewegt sich in der gleich Größenordnung, wie sie bereits in dem ONPG-Test für Flüssigkulturen mit pUC18 und pfr2U2 in PA-Medium gemessen wurde (3.7.2.).

Für die *E. coli* DH5 α Klone, die das Hybridplasmid pTGA-32 trugen, das als Positivkontrolle dienen sollte, wurden in den verschiedenen Ansätzen gleiche bzw. höhere Werte gemessen als in denen mit pUC18. Die Unterschiede waren allerdings auf das Testsystem zurückzuführen und der optische Vergleich zeigte eindeutig, daß kein signifikanter Unterschied in der β -Galactosidase Aktivität der beiden Plasmide vorlag.

Die *E. coli* DH5 α Klone mit den unterschiedlichen Reportergenkonstrukten wurden in dem beschriebenen Testsystem untersucht, die Werte sind in der Tab.07 zusammengefaßt. Die β -Galactosidase Aktivitäten der Klone, die für das Überlesen des TGA Codons relevante Aussagen liefern, sind nocheinmal in Abb.71 (4.4.3.) graphisch dargestellt.

Klon	Besonderheit des Konstrukts bez. des UGA Codons	β -Galactosidase Aktivität / U_x	Standard- abweichung
<i>E. coli</i> DH5 α	enthält kein RGF-Plasmid	0,000	0,236
<i>E. coli</i> pUC18	Ausgangsplasmid, optimale Expression	280,713 ^e	68,941 ^e
<i>E. coli</i> fr2U2	enthält <i>in frame</i> UGA und downstream <i>in frame</i> AUG Startcodon	27,303	7,947
<i>E. coli</i> TGA-1	<i>lacZ</i> Startcodon ist nicht <i>in frame</i> , AUG des Insert einzig möglicher Start	7,199	2,648
<i>E. coli</i> ATG-8	enthält <i>in frame</i> UGA Codon, aber kein downstream AUG Startcodon, Expression nur über <i>lacZ</i> Startcodon möglich	2,255	0,259
<i>E. coli</i> ATG-1	enthält <i>in frame</i> UGA Codon, aber kein downstream AUG Startcodon, Basensequenz in der SECIS verändert	9,442	1,865
<i>E. coli</i> Δ FR50	enthält <i>in frame</i> UGA Codon, downstream Bereich bis auf 50 bp deletiert	-0,034	0,534
<i>E. coli</i> Δ FR20	enthält <i>in frame</i> UGA Codon, downstream Bereich bis auf 20 bp deletiert	0,389	0,222

Tab.07: Vergleich der β -Galactosidase Aktivität verschiedener *E. coli* Klone, basierend auf *E. coli* DH5 α , in das die in 3.9.1. beschriebenen Hybridplasmide transformiert wurden. Die Werte wurden durch den in 2.25.2. beschriebenen *in vivo* Test gemessen, wobei die Anzucht der Bakterien in PA-Medium erfolgte. Die Aktivität ist in der relativen Einheit U_x dargestellt. Der Wert für die pUC18 tragenden Klone wurde basierend auf der Messung nach einer Inkubationszeit von 5,5 h extrapoliert (s.o.) und gekennzeichnet (^e).

Die β -Galactosidase Aktivität von 9,4 U_x in *E. coli* TGA-1 sowie der Unterschied zwischen *E. coli* fr2U2 und *E. coli* ATG-8 zeigten auf, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine Expression von dem ATG Startcodon innerhalb der *B. japonicum* 110spc4 DNA-Sequenz (bp 3200-3202 in Abb.19) aus stattfand.

Die β -Galactosidase Aktivität von 2,3 U_x in *E. coli* ATG-8 sowie der Unterschied in der β -Galactosidase Aktivität zwischen *E. coli* fr2U2 und *E. coli* TGA-1 zeigten, daß unter diesen Versuchsbedingungen ein Überlesen des TGA Codons innerhalb der *B. japonicum* 110spc4 DNA-Sequenz (bp 3110-3112 in Abb.19) erfolgte.

In dem Klon *E. coli* Δ FR50 war unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine β -Galactosidase Aktivität meßbar. Und auch die β -Galactosidase Aktivität von 0,4 U_x , die in *E. coli* Δ FR20 gemessen wurde, wies unter Beachtung der Standardabweichungen keine deutlichen Unterschiede zu *E. coli* DH5 α und *E. coli* Δ FR50 auf.

Damit wurde bewiesen, daß ein Überlesen des TGA Codons aus *B. japonicum* 110spc4 in *E. coli* DH5 α stattfand und die downstream DNA-Sequenz für den Vorgang essentiell war.

4. Diskussion

4.1. Die *TnphoA*-Insertion in *B. japonicum* 2-10 beeinflusst das Wachstum und die Entwicklung der Bakterien

In dem ca. 8700 kb großen Genom von *B. japonicum* USDA110, das aus einem zirkulären Chromosom besteht, sind die direkt an der Nodulation und der symbiotischen Stickstoff-Fixierung beteiligten Gene in einer ungefähr 380 kb langen Sektion geclustert, die als symbiotische Region bezeichnet wird (Kundig *et al.*, 1993). Eine solche lokalisierte Ansammlung symbioserelevanter Gene wurde auch in anderen Rhizobien identifiziert, sie liegt auf separaten Plasmiden vor, wie beispielsweise bei *Sinorhizobium meliloti*, oder aber auf dem Chromosom, wie das ca. 500 kb lange Segment bei *Mesorhizobium loti* (Sullivan *et al.*, 1995).

Da aber auch außerhalb dieser Region symbioserelevante Gene lokalisiert sind, ist es keineswegs außergewöhnlich, daß die *TnphoA*-Insertion in *B. japonicum* 2-10 nicht im Bereich der symbiotischen Region liegt und dennoch starken Einfluß auf den freilebenden Phänotyp der Bakterien wie auch auf die Interaktion mit *Glycine max* bv. Maple Arrow hat.

4.1.1. Die phänotypischen Besonderheiten von *B. japonicum* 2-10 in Reinkultur

Die Messung der OD₆₀₀ der Stämme *B. japonicum* 110*spc4* und *B. japonicum* 2-10 hat Unterschiede im Wachstum unter optimierten Bedingungen aufgezeigt. Ab einer OD₆₀₀ \approx 3 steigt die optische Dichte der Mutante deutlich langsamer an, das Maximum wird zwar etwa zum gleichen Zeitpunkt erreicht wie bei dem WT, es liegt aber bei OD₆₀₀ \approx 4, während *B. japonicum* 110*spc4* OD₆₀₀ \approx 7 erreicht (siehe Abb.12).

Durch die parallele Messung der LZZ der beiden Stämme ist belegt worden, daß sich diese entgegen der optischen Dichte nicht in der Zahl der cfu·ml⁻¹ voneinander unterscheiden (siehe Abb.11). Nach dem Erreichen der stationären Phase geht die Mutante *B. japonicum* 2-10 allerdings schneller in die Absterbephase über. *B. japonicum* 2-10 ist demnach unter eingeschränkten Bedingungen nicht so überlebensfähig wie der WT. Die Mutation schwächt folglich *B. japonicum* 2-10 in seiner Resistenz gegen Stress.

Auch eine andere künstlich herbeigeführte Stresssituation belegt diese These, die Anzucht unter starker Veränderung der äußeren Bedingungen. Bei einem Mediumswechsel (selbst von einem zu einem anderen Vollmedium) hat *B. japonicum* 2-10 eine deutlich verlängerte lag Phase (siehe Abb.13).

Unter mikroaeroben Anzuchtbedingungen zeigen sich keine weiteren Unterschiede im Wachstum zwischen *B. japonicum* 2-10 und *B. japonicum* 110*spc4*, dieser Faktor hat also keine negativen Auswirkungen auf *B. japonicum* 2-10 unter freilebenden Bedingungen.

Das mit stärkerer Schleimbildung verbundene Wachstum von *B. japonicum* 2-10 auf Agarplatte zeigt bereits, daß eine Veränderung in der äußeren Form bzw. den exkretierten Bestandteilen gegenüber dem WT auftritt.

Nach der Zentrifugation aerob angezogener Flüssigkulturen gleicher OD₆₀₀ und LZZ zeigt sich diese Vermutung bestätigt. Das bei *B. japonicum* 2-10 kleinere Bakterienpellet und die dafür deutlich voluminösere als „Schleimwolke“ beschriebene lichtundurchlässige Fraktion über dem Pellet, die zu einem großen Anteil aus Bakterien besteht, belegt den Unterschied zum WT (Abb.64; siehe Abb.14). Die Zellen in dieser nicht pelletierenden Fraktion sind bei beiden Stämmen deutlich größer als die im Pellet. Darüberhinaus zeigt sich bei diesen Messungen, daß die Zellen der Mutante *B. japonicum* 2-10 jeweils deutlich kleiner sind, als die des WT (siehe Abb.15).

Die niedrigere OD₆₀₀ von *B. japonicum* 2-10 ab der späten logarithmischen Phase scheint demnach auf das geringere Zellvolumen zurückzuführen zu sein. Die gleiche OD₆₀₀ während der ersten Stadien des Wachstums wird folglich, trotz der geringeren Größe von *B. japonicum* 2-10, durch einen Unterschied in den sekretierten unlöslichen Komponenten hervorgerufen, der auch für die stärkere Vernetzung und damit die Bildung der Schleimwolke verantwortlich ist.

Die EPS sind ein essentieller Teil der Signalkaskade zwischen Rhizobien und Fabaceen (Djordjevic *et al.*, 1987; Spaink, 2000) und eine Veränderung in ihrer Zusammensetzung hat in allen gezeigten Fällen einen (meist negativen) Einfluss auf die Interaktion mit dem pflanzlichen Partner, da qualitativ und quantitativ intakte EPS nötig sind, um die Auslösung der Abwehrreaktion von *Glycine max* zu unterdrücken (Parniske *et al.*, 1994; Becker *et al.*, 1998).

Die Zusammensetzung der von *B. japonicum* synthetisierten EPS ist vom Genotyp, aber auch von der C-Quelle abhängig, auf der die Bakterien wachsen (Karr *et al.*, 2000). Damit

lassen sich die Unterschiede in der Zusammensetzung der EPS von *B. japonicum* 110spc4 zu der in den vorangegangenen Experimenten erklären, da in diesen zum Vergleich angeführten Anzuchten das Wachstum für 6 d in BAG-Medium, unter optimierten Bedingungen für die EPS Gewinnung, erfolgte (Becker *et al.*, 1998). In den hier dargestellten Untersuchungen dagegen ist die Anzucht der Bakterien in 20E-Medium durchgeführt worden, um mit den verschiedenen anderen Experimenten vergleichbare Bedingungen zu haben.

Die EPS der von uns untersuchten Mutante *B. japonicum* 2-10 sind, wie beim WT, aus einer LMW- und einer HMW-Fraktion zusammengesetzt. Es zeigt sich allerdings ein geringer Unterschied im Verhältnis der beiden EPS-Fractionen zueinander. Im Vergleich zu dem Verhältnis von LMW-EPS zu HMW-EPS bei *B. japonicum* 110spc4, das bei 4,7:1 liegt, beträgt es bei *B. japonicum* 2-10 nur 3,9:1 und ist somit zugunsten des HMW-EPS verschoben (Abb.64, siehe Abb.16).

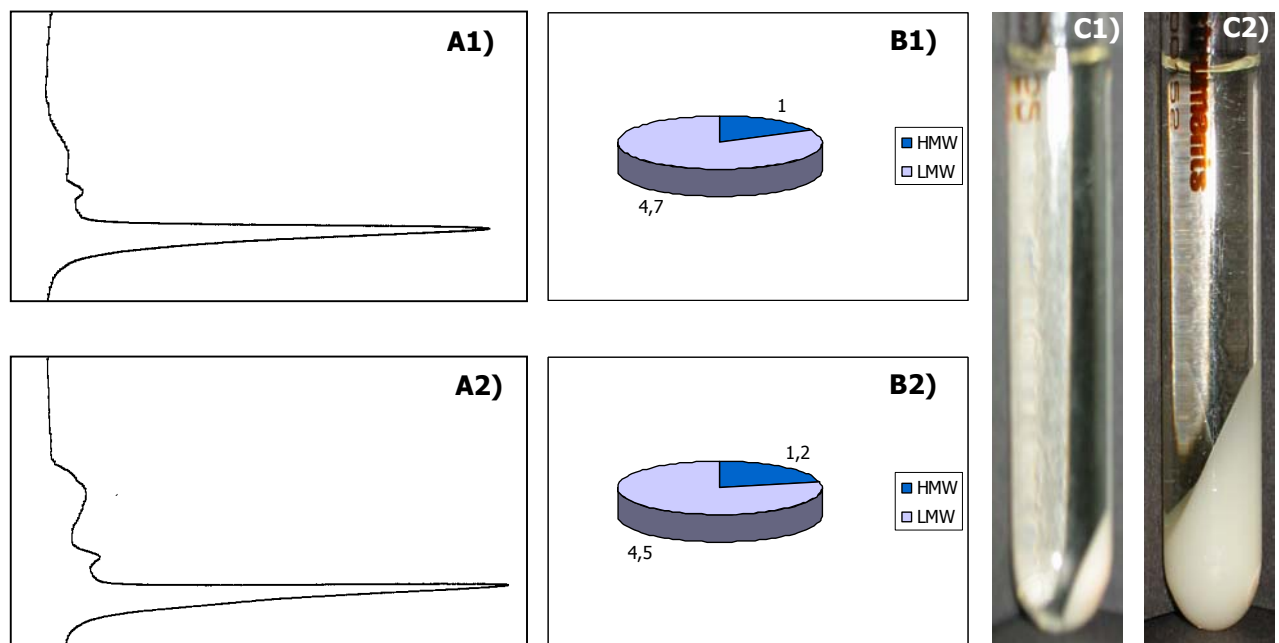


Abb.64: Graphische Darstellung der isolierten löslichen EPS von *B. japonicum* 110spc4 (A1) und *B. japonicum* 2-10 (A2), sowie des Massenverhältnisses zwischen der HMW-Form und der LMW-Form in dem EPS der Stämme *B. japonicum* 110spc4 (B1) und *B. japonicum* 2-10 (B2).

C) Photographische Dokumentation der Bakterienkulturen von *B. japonicum* 110spc4 (C1) und *B. japonicum* 2-10 (C2) nach Wachstum bis $OD_{600} = 4,5$ und anschließender Zentrifugation (10.000 g; 6 min).

Ob der leicht erhöhte Anteil HMW-Fraktion im löslichen EPS von *B. japonicum* 2-10 auch auf die verstärkte Exkretion größerer unlöslicher Polysaccharide hindeutet oder andere Stoffgruppen beteiligt sind, die eine verstärkte Vernetzung und damit die vergrößerte Schleimwolke verursachen, konnte nicht gezeigt werden. So können beispielsweise keine

Aussagen bezüglich der gebundenen Kapsel- und Lipopolysaccharide gemacht werden, die auch für die Interaktion der Bakterienzelle mit ihrer Umgebung relevant sind (Mort *et al.*, 1980; Stacey *et al.*, 1991; Eggleston *et al.*, 1996; Perret *et al.*, 2000). Da die Mutation in *B. japonicum* 2-10 allerdings Auswirkungen auf verschiedene intra- und interzelluläre Vorgänge hat, scheint eine Beeinflussung der exkretierten Syntheseprodukte der Bakterienzellen nicht unwahrscheinlich.

Die zusätzliche Fraktion im Gesamtprotein, die im SDS-PAG unter mikroaeroben Bedingungen zu sehen ist, deutet klar auf einen spezifischen Effekt der mutierten Region unter diesen Bedingungen hin (siehe Abb.17). Es ist nicht geklärt worden, ob es sich bei der Bande um Ub12 handelt oder um Proteine, deren Regulation durch die Mutation gestört wird.

Die deutlich geringere molekulare Masse von ca. 27 kDa, verglichen mit der für Ub12 anhand der abgeleiteten AS-Sequenz berechneten molekularen Masse von ca. 32 kDa, kann eine Folge von posttranslationalen Modifizierungen sein. Es ist in diesem Kontext auch zu beachten, daß die AS-Sequenz von Ub12 10 Cysteine beinhaltet, eine überdurchschnittliche Menge, die über die Ausbildung von Disulfidbrücken evtl. eine Globulisierung des Proteins im SDS-PAGE bewirken können und damit die Diffusion im Gel beschleunigt ist. Allerdings würde man bei einer Expression von *ub12*, die so stark ist, daß sie selbst mittels eindimensionaler SDS-PAGE differenziert werden kann, eine wesentlich stärkere Expression des Reportergens *phoA* in *B. japonicum* 2-10 bei unter diesen mikroaeroben Bedingungen angezogenen Kulturen erwarten. Ein deutlicher Unterschied in der alkalischen-Phosphatase-Aktivität bei mikroaerober Anzucht ist, zumindestens beim Wachstum auf Agarplatten, nicht vorhanden (siehe Abb.09).

Nach aerober Anzucht kann kein Unterschied zwischen dem Proteom von *B. japonicum* 110*spc4* und dem von *B. japonicum* 2-10 mittels eindimensionaler SDS-PAGE aufgezeigt werden (siehe Abb.17). Wenn keine eindeutigen Unterschiede bei der SDS-PAGE sichtbar werden, bedeutet das nicht, daß keine vorliegen. Die eindimensionale Auftrennung ermöglicht solche ausschließenden Aussagen nicht, da eine Bande eine Vielzahl völlig verschiedener Proteine beinhaltet.

Aufgrund der auch unter aeroben Wachstumsbedingungen auftretenden phänotypischen Veränderungen der Mutante *B. japonicum* 2-10 ist eine Veränderung im Proteom zu erwarten, abhängig von der Expressionsstärke der direkt oder regulatorisch betroffenen Gene.

Die geringere Zellgröße und das frühere Übergehen in die Phase der Seneszenz, unter freilebenden Bedingungen, deuten auf eine beschleunigte Alterung der Bakterien hin, was die Unfähigkeit zur Differenzierung zu Bakteroiden in der Symbiose erklären kann (Santos *et al.*, 2000).

4.1.2. Die Defizite von *B. japonicum* 2-10 in der symbiotischen Interaktion mit *Glycine max* bv. Maple Arrow

Das symbiotische Verhältnis von *B. japonicum* 2-10 mit *Glycine max* bv. Maple Arrow ist auf mehreren Ebenen gestört.

Diese Insertion des Transposon *TnphoA* in das Genom von *B. japonicum* 110*spc4* hat demnach einen DNA-Bereich getroffen, der in verschiedenen Stadien und Vorgängen der bakteriellen Entwicklung von Bedeutung ist.

Die reduzierte Nodulierung zeigt, daß *B. japonicum* 2-10 nur eingeschränkt zur Induzierung von Knöllchen befähigt ist, es sind also bereits diese ersten Schritte in der Kommunikation mit *Glycine max* bv. Maple Arrow beeinträchtigt (siehe Tab.01).

Möglicherweise sind die Bakterien nicht zur entsprechenden Entwicklung und Vermehrung in der Rhizosphäre befähigt, was sich mit den Beobachtungen unter freilebenden Bedingungen deckt, in denen *B. japonicum* 2-10 bei der Anpassung an veränderte Umstände im Wachstum deutlich verzögert ist. Die verlangsamte Vermehrung hätte zur Folge, daß die Bakterienzellen von vorneherein nicht gut in der Rhizosphäre positioniert sind, was aber für den Infektionsprozeß von entscheidender Bedeutung ist (Lopez-Garcia *et al.*, 2002).

Eine eventuell verminderte Kompetitivität in der Rhizosphäre bzw. bei der Infektion spielt in diesen Analysen keine Rolle, da der zur Infektion eingesetzte Bakterienstamm jeweils solitär im Medium vorliegt. Versuche zur Kompetitivität von *B. japonicum* 2-10 wurden nicht durchgeführt, da die Mutante in einigen Pflanzentests bereits als solitärer Bakterienstamm Nod⁻ war und eine gemeinsame Inokulation mit dem WT daher keine weiteren Erkenntnisse hätte liefern können.

Die geringere Zellgröße und das frühere Übergehen der Kulturen in die Absterbephase deuten auf eine beschleunigte Alterung der Bakterien unter freilebenden Bedingungen hin. Eine vorzeitige Seneszenz der Rhizobien kann eine reduzierte Nodulierung der Pflanzen in der Symbiose verursachen, sowie die Unfähigkeit der Bakterien zur Differenzierung zu Bakteroiden (Santos *et al.*, 2000).

Die Bildung einer gleichmäßigen Wachstumszone, wie sie in der Anzucht der *B. japonicum* Stämme in Weichagar auftritt, basiert sowohl auf Wachstum in diesem Bereich vorhandener Zellen als auch auf Aerotaxis (Zhulin *et al.*, 1996). Die Tatsache, daß die ausgebildeten Wachstumszonen bei WT und Mutante *B. japonicum* 2-10 optisch nicht zu unterscheiden sind, läßt darauf schließen, daß die Mutante *B. japonicum* 2-10 weder in ihrer Aerotaxis noch in ihrer Motilität eingeschränkt ist (siehe Abb.18).

Die elektronenmikroskopische Untersuchung hat gezeigt, daß *B. japonicum* 2-10 dennoch kaum in der Lage ist, das innere Gewebe der Wurzelknöllchen zu besiedeln (siehe Abb.08). Dies kann daran liegen, daß schon die Penetration der Wurzelhaare wesentlich seltener gelingt als beim WT.

Die bereits beschriebene verschlechterte Anpassungsfähigkeit von *B. japonicum* 2-10 an sich ändernde Bedingungen kann die Beobachtung erklären, daß die Bakterioide aus den Infektionsschläuchen nicht zu einer großflächigen Infektion der Zellen in der Lage sind. Die intakten Bakterien in den Infektionsschläuchen und die verschiedenen Degradationsstadien der Bakterioide im Wurzelknöllchen lassen darauf schließen, daß die wenigen Bakterien, die zur Infektion der Wurzelhaare befähigt waren, „spätestens“ nach dem Übergang in das intrazelluläre Stadium von den Pflanzenzellen des inneren Gewebes nicht als Symbiont akzeptiert und daraufhin lysiert werden.

B. japonicum 2-10 ist allerdings - wie der WT – befähigt, auch unter mikroaeroben Bedingungen zu wachsen, was die mikroaeroben Anzuchten und das Wachstum im Weichagar beweisen. *B. japonicum* 2-10 wäre somit in der Lage, im Knöllchengewebe zu überleben, zu wachsen und auch Zellteilungen durchzuführen (bezogen auf den dort herrschenden Sauerstoffpartialdruck). Die Unterschiede zum WT müssen demnach in der Interaktion mit der Pflanze begründet liegen. D.h. man kann von einer aktiven Abwehr der Pflanze ausgehen, wie sie in abgeschwächter Form in den frühen Stadien der Nodulation und anderer Infektionen von Leguminosen durch Mikroorganismen beobachtet werden kann (Salzer *et al.*, 2000) und durch verschiedenste genetische Veränderung der Mikrosymbionten verstärkt hervorgerufen wird (z.B. Eggleston *et al.*, 1996; Hombrecher *et al.*, 1984; Parniske *et al.*, 1994; Spaink, 2000).

Das große Vakuom der Pflanzenzellen entspricht weniger einer meristematischen oder einer infizierten Zelle als eher einer ausdifferenzierten Zelle, das Fehlen einer großen Einzelvakuole weist aber auf den Unterschied hin.

Die EPS der von uns untersuchten Mutante sind ein Ansatzpunkt, der diese Vorgänge innerhalb der Infektion erklären kann. *B. japonicum* 2-10 exkretiert, wie der WT, EPS bestehend aus einer HMW- und einer LMW-Fraktion, und es zeigt sich nur ein sehr geringer Unterschied im Verhältnis der beiden EPS-Fraktionen zueinander. Auch eine solche Verschiebung des Verhältnisses von LMW-EPS zu HMW-EPS, zugunsten der hochmolekularen Fraktion, kann bei *B. japonicum* 110*spc4* zu einem negativen Effekt auf die Ausbildung der Symbiose mit *Glycine max* führen. Dies wurde bereits anhand der *exoP* Mutante *B. japonicum* EH3 gezeigt, die einen erhöhten Anteil an HMW-EPS hat, resultierend in einem symbiotischen Phänotyp, der dem der Mutante *B. japonicum* 2-10 stark ähnelt: sie ist Fix^- , mit der Induktion einer sehr geringen Knöllchenzahl bei *Glycine max* bv. Maple Arrow (durchschnittlich zwei Knöllchen pro Pflanze), sowie sehr schwacher Infektion bei starker Vakuolisierung der Knöllchenzellen (Becker *et al.*, 1998).

Die chlorotischen Blätter und die unterentwickelten Früchte der Sojabohne *Glycine max* bv. Maple Arrow, im Zusammenleben mit der Mutante *B. japonicum* 2-10, deuten direkt auf eine Unterversorgung mit gebundenem Stickstoff hin (siehe Abb.05). Der Acetylenreduktionstest beweist, daß keine Fixierung von Luftstickstoff in den Wurzelknöllchen aus der Symbiose von *Glycine max* bv. Maple Arrow mit *B. japonicum* 2-10 stattfindet.

Da der Stamm *B. japonicum* 2-10 unter freilebenden Bedingungen in der Lage ist, N_2 zu binden, muß der Fix^- Phänotyp darauf zurückzuführen sein, daß die Zahl der Mikrosymbionten zu gering ist, um eine evtl. vorhandene Nitrogenase-Aktivität messen zu können oder aber die Interaktion zwischen Sojabohne und Rhizobium so stark beeinträchtigt ist, daß die Rhizobien keine symbiontische Fixierung von Luftstickstoff durchführen (West *et al.*, 2002).

Die Messung von Nitrogenase-Aktivität im High K⁺ Weichagar bei einer 14 d alten *B. japonicum* 110*spc4* und einer 21 d alten *B. japonicum* 2-10 Kultur weist darauf hin, daß die Anpassungen an die veränderten Bedingungen bei *B. japonicum* 2-10 auch bezüglich der bakteriellen Stoffwechselvorgänge langsamer verlaufen.

Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß *B. japonicum* 2-10 trotz der phänotypischen Änderungen vermutlich eine effektive Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow eingehen würde, wenn sie von der Pflanze als Mikrosymbiont erkannt werden würde.

Von pflanzlicher Seite werden in den gebildeten Knöllchen entsprechende Kohlenhydrate für die Bakterioide in Form von Amyloplasten (Stärkekörnern) zur Verfügung gestellt, die aber aufgrund des Fehlens von Bakteroiden ungenutzt bleiben. Die Wurzelknöllchen, die aus der Symbiose von *Glycine max* bv. Maple Arrow mit *B. japonicum* 2-10 resultieren, sind aber im Inneren weiß. Das bedeutet, es findet keine signifikante Synthese von Leghämoglobin auf Seiten der Pflanze statt. Die Expression der pflanzlichen Leghämoglobin Gene erfolgt während der Infektion durch die Rhizobien und ist unabhängig vom Auftreten von Nitrogenase-Aktivität (Verma *et al.*, 1981; Brisson *et al.*, 1982). Auch diese beiden gegensätzlichen Beobachtungen zeigen, daß *Glycine max* bv. Maple Arrow ihre Stoffwechselvorgänge nicht vollständig auf die Ausbildung einer Rhizobien-Endosymbiose einstellt.

Auch 35 dpi zeigt sich keine Verbesserung des Pflanzenwachstums oder der Nodulierung. Die Nodulierung ist demnach nicht nur verzögert, wie es die verlangsamte Anpassung der Mutante suggerieren könnte, sondern *B. japonicum* 2-10 ist nicht zur einer effektiven Besiedlung von *Glycine max* bv. Maple Arrow befähigt.

4.1.3. Die *TnphoA*-Insertion ist partiell komplementierbar

Durch die Integration von WT-DNA-Fragmenten in die Mutante *B. japonicum* 2-10, die die *TnphoA*-Insertion überbrücken, kann keine Komplementation der reduzierten Nodulierung oder des Fix⁻ Phänotyps der Pflanzen erreicht werden.

Weder das kleine DNA-Fragment, das in *B. japonicum* 210-bvΔ den ORF *ub12* genetisch komplementiert, noch das große Fragment in *B. japonicum* 210-1011-u, mit dem die ORFs *ub12*, *ub4* und *ub5* sowie die upstream Region bis zu *intA* in das Genom von *B. japonicum* 2-10 integriert ist, verändern Anzahl, Größe oder Fixierungsleistung der Wurzelknöllchen von *Glycine max* bv. Maple Arrow.

Bezüglich der Besiedlung der Wurzelknöllchen zeigen sich dagegen deutliche Veränderungen.

Die Mutante *B. japonicum* 210-bvΔ entspricht der Ausgangsmutante *B. japonicum* 2-10 in allen untersuchten Belangen. Mittels des Hybridplasmids pbvΔ, dessen Insert nach der Integration ins Genom von *B. japonicum* 2-10 den ORF *ub12* – den Ort der *TnphoA*-Insertion - wieder herstellt, wird keine Verbesserung der Knöllchenbesiedlung bewirkt (siehe Abb.37).

Die Mutante *B. japonicum* 210-1011-u dagegen ist, bezogen auf die Infizierung der Wurzelknöllchen von *Glycine max* bv. Maple Arrow, nahezu vollständig komplementiert. Die Integration des gesamten DNA-Bereiches von 1500 bp upstream bis 1700 bp downstream der *TnphoA*-Insertion bewirkt die Wiederherstellung der Fähigkeit zur Besiedlung des Knöllchens (siehe Abb.38).

Ein downstream-Effekt, der aufgrund dieser Beobachtung zuerst vermutet wurde, kann aufgrund der weiterführenden Untersuchungen durch VIM in *B. japonicum* 110*spc4* ausgeschlossen werden.

4.2. Die ORFs im Bereich der *TnphoA*-Insertion von *B. japonicum* 2-10 zählen zur Gruppe der *house-keeping* Gene

Die in dieser Arbeit dargestellten ORFs von *B. japonicum* 110*spc4* werden aufgrund der Nukleotidsequenz und der daraus abgeleiteten AS-Sequenz als offener Leserahmen (ORF) bezeichnet. Die Kriterien, die alle als ORF definierten DNA-Bereiche erfüllen, sind das Vorkommen eines Startcodons mit einer entsprechenden Shine-Dalgarno-Sequenz, eine möglichst hohe Codierwahrscheinlichkeit innerhalb dieses Leserahmens und ein Stoppcodon. Das führt dazu, daß ein ORF nicht durch ein Stoppcodon unterbrochen sein kann, sonst wäre er ja bereits an dieser Stelle beendet worden. Im Fall des ORF *ub12* wird diese Regel allerdings außer Kraft gesetzt, da davon auszugehen ist, daß das *in frame* vorliegende TGA Codon nicht als Stoppcodon fungiert.

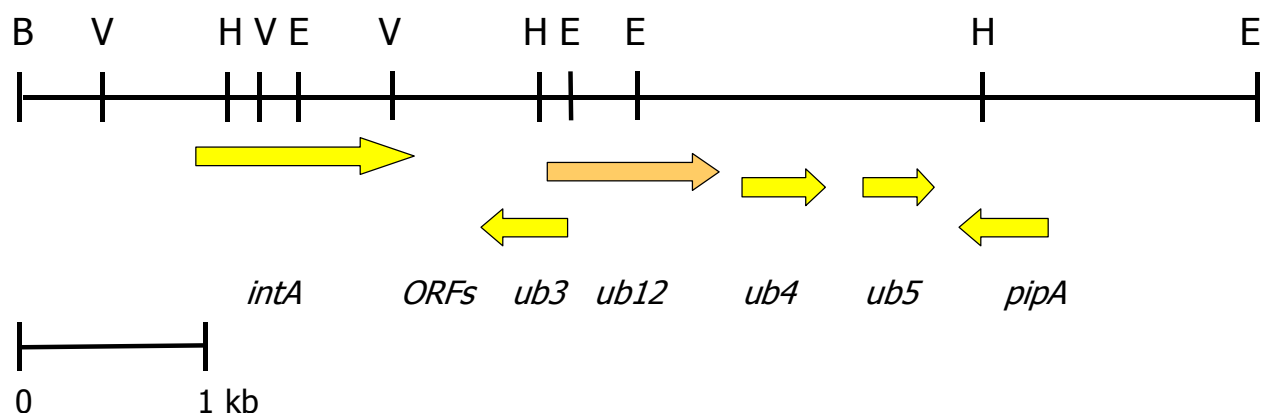


Abb.65: Graphische Darstellung der untersuchten genetischen Region aus dem Genom von *B. japonicum* 110*spc4*. Sechs ORFs sind in der 6,7 kb langen DNA-Sequenz enthalten, symbolisiert durch Pfeile. Die Orientierung des Pfeils gibt die Leserichtung des jeweiligen ORFs an. Die unterschiedlichen Leseraster werden durch die Höhenverschiebung der Pfeile dargestellt. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI (B), *Eco*RI (E), *Eco*RV (V) und *Hind*III (H) sind gekennzeichnet.

Das Genom der Rhizobien hat einen GC-Gehalt von durchschnittlich 61-65 mol% in der DNA (Jordan, 1982).

Basierend auf Sequenzdaten-Vergleichen werden die bekannten Gene von *B. japonicum* in drei Gruppen eingeteilt (Ramseier *et al.*, 1991). Gruppe I enthält die *nod* Gene und Gruppe II die NifA-regulierten Gene, die Vertreter beider Gruppen haben einen GC-Gehalt von ca. 58 mol% in der DNA, was deutlich unter dem Durchschnittswert von 61-65 mol% der Gene in *B. japonicum* liegt. In der Gruppe III sind die Gene des Grundstoffwechsels und diejenigen, die nicht zu den Gruppen I und II gehören, zusammengefaßt. Die Gene der Gruppe III werden als *house-keeping* Gene bezeichnet und sie haben einen durchschnittlichen GC-Gehalt von ca. 65 mol%.

Der GC-Gehalt der DNA der sechs innerhalb dieser Arbeit untersuchten ORFs ist in Tab.08 aufgelistet, er liegt zwischen 62,1 mol% (*ub3*) und 66,0 mol% (*ub4*). Nach der Einteilung von Ramseyer und Göttfert werden diese ORFs demnach der Gruppe der *house-keeping* Gene zugeordnet.

ORF	<i>intA</i>	<i>ub3</i>	<i>ub12</i>	<i>ub4</i>	<i>ub5</i>	<i>pipA</i>
GC-Gehalt	63,7 mol%	62,1 mol%	63,4 mol%	66,0 mol%	64,3 mol%	62,4 mol%

Tab.08: Auflistung des GC-Gehaltes der untersuchten ORFs im Bereich der *TnphoA*-Insertion in *B. japonicum* 2-10, angegeben in mol% GC bezogen auf die gesamte DNA-Sequenz des jeweiligen ORFs.

Aussagen zur Funktion des potentiellen Genproduktes können nur im Fall von *IntA* gemacht werden. Die großen Ähnlichkeiten in der Sequenz mit bekannten Integrase Genen und die Relevanz für die Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow lassen darauf schließen, daß *intA* exprimiert wird und daß es sich bei dem Genprodukt um eine cytoplasmatische Integrase handelt.

4.2.1. *ub12*, symbiotische Relevanz und Expression in *B. japonicum* 110*spc4*

Die Beeinträchtigung der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow, hervorgerufen durch die Unterbrechung des ORF *ub12* durch VIM in der Mutante *B. japonicum* frΔ24, beweist die symbiotische Relevanz von *ub12*.

Die Nodulierung ist nicht entscheidend verändert. Unter Berücksichtigung der Untersuchung von *B. japonicum* 2-10, bei der die genetische Komplementation von *ub12*

keine Veränderung in der Nodulierung (allerdings in diesem Fall keine Verbesserung) bewirkt, kann gefolgert werden, daß *ub12* selbst nicht entscheidend an der Induktion von Wurzelknöllchen in der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow beteiligt ist.

Die Besiedlung der Wurzelknöllchen durch *B. japonicum* fr Δ 24 ist dagegen stark eingeschränkt und entspricht etwa dem Phänotyp von *B. japonicum* 2-10, daraus folgt, daß *ub12* direkt an der Infizierung beteiligt zu sein scheint (siehe Abb.39).

Die Insertion von pbv Δ (enthält den gesamten vorher als *ub2* bezeichneten DNA-Bereich) in das Genom von *B. japonicum* 110*spc4*, die in der Mutante *B. japonicum* bv Δ vorliegt, bestätigt diese Aussagen, da bei ihr sowohl die Nodulierung als auch die Infizierung nahezu dem WT entsprechen. Dennoch ist auch diese Mutante in der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow eingeschränkt, vor allem in der Fixierungsleistung (siehe Abb.36). Das belegt, daß weitere Faktoren in der untersuchten DNA-Region von *B. japonicum* 110*spc4* eine Rolle spielen. Entscheidend könnte beispielsweise die Organisation der ORFs zueinander sein, die Kopienzahl der vorhandenen ORFs oder auch die Sekundärstruktur der gebildeten mRNA, Faktoren, die durch die VIM beeinflusst werden.

Die Expression von pORF12 in *E.coli* M15 ergibt ein Translationsprodukt von ca. 35 kDa (siehe Abb.50). Dies entspricht in etwa der *in silico* für Ub12 vorausgesagten Größe von 32,5 kDa und belegt, daß eine Translation von *ub12* in *E. coli* stattfindet, wenn die Expressionshöhe auch deutlich verringert ist (bezogen auf das verwendete Expressionssystem).

Es erfolgt keine zusätzliche Produktion eines verkürzten Polypeptides von pORF12, was auf einen weiteren Translationsstart und damit auf zwei getrennte ORFs hindeuten würde. Diese Beobachtung deckt sich nicht mit den Ergebnissen der Reporterfusionen, die einen Translationsstart von dem downstream gelegenen ATG Startcodon aus in *E. coli* belegen, was darauf hindeutet, daß die äußeren Bedingungen während der Expression eine entscheidende Rolle spielen.

Im SDS-PAG dieser Expressionsstudien ist eine Doppelbande zu sehen, was z.B. in einer posttranslationalen Prozessierung begründet sein kann, die nicht vollständig abgelaufen ist bzw. einer längeren Reaktionszeit bedarf. Dies kann als Hinweis für eine mögliche posttranslationale Modifikation in *B. japonicum* 110*spc4* angesehen werden, wie sie für die in diesem System identifizierte 27 kDa Bande bereits diskutiert worden ist (s.o.).

Es bleibt zu beachten, daß das Laufverhalten in einer SDS-PAGE nicht hundertprozentig einheitlich ist und anhand der Längenmarker auch nicht exakt gemessen werden kann (Hohl *et al.*, 1993); praktische Erfahrungen zeigen, daß Abweichungen bis zu 10 % auftreten können. Die Voraussage eines Molekulargewichtes durch computergestützte Berechnung anhand der AS-Sequenz liefert darüberhinaus nur einen ungefähren Wert, Beleg dafür ist, daß verschiedene Computerprogramme unterschiedliche Werte liefern (Differenz > 1 kDa).

Außerdem kann es – wie angesprochen - zu posttranslationalen Modifikationen von Genprodukten in der Zelle kommen, die Veränderungen des molekularen Gewichtes mit sich bringen (Voet *et al.*, 1992; Wolfe, 1993).

Die Fusion mit dem Reportergen *phoA*, die in der Mutante *B. japonicum* 2-10 vorliegt, hat in den durchgeführten Experimenten keine klaren Erkenntnisse zur Expression von *ub12* liefern können, auch weil bereits der WT *B. japonicum* 110*spc4* alkalische Phosphatase Aktivität entwickelt.

Die Expression von Genen in *B. japonicum* kann stark von den äußeren Umständen abhängen. Die sehr unterschiedlichen Umweltbedingungen, unter denen *B. japonicum* existieren kann, beeinflussen direkt die Expression einzelner Genorte, die z.B. symbiotisch relevant sind.

So induzieren die Flavonoide der Wirtspflanze in Kombination mit dem positiven Regulatorprotein NodD in vielen Rhizobien die Transkription der *nod/nol* Gene (Hombrecher *et al.*, 1984; Downie *et al.*, 1985; Kossak *et al.*, 1987; Sadowsky *et al.*, 1988; Long, 1989; Schlaman *et al.*, 1992), die für die Infektion und die Knöllchen-Differenzierung nötig sind (Stacey, 1995)

Die Induktion der Expression spezifischer Gene erfolgt durch mikroaerobe Bedingungen, wie sie in den Knöllchen herrschen (Batut *et al.*, 1994; Fischer, 1996; Chauhan *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 2001); in den meisten Fällen handelt es sich um symbioserelevante Gene, oft um solche, die für die Stickstoff-Fixierung essentiell sind. Aber auch anaerobe Bedingungen können die Induktion symbioserelevanter Gene verursachen (Fischer *et al.*, 2001), wobei NifA als Aktivator anaerob induzierter Gene der symbiotischen Region im Genom von *Bradyrhizobium japonicum* angesehen wird (Nienaber *et al.*, 2000).

Das Wachstum auf bestimmten Kohlenstoffquellen kann in *B. japonicum* eine Inhibierung der *nodD₁* und *nodY* Expressierung bewirken (Joyce *et al.*, 1996). Wie auch die Verfügbarkeit von Stickstoff eine Rolle spielt, so ist in *B. japonicum* eine verstärkte

Induktion der *nodC* Expression durch Genistein zu beobachten, wenn die Bakterien unter N-Mangel angezogen werden (Lopez-Garcia *et al.*, 2001).

Die komplexen Veränderungen im Phänotyp von *B. japonicum* 2-10, verglichen mit dem des WT, die durch die Integration von *TnphoA* in den ORF *ub12* verursacht werden, spielen demnach unter verschiedenen äußeren Bedingungen eine unterschiedlich große Rolle für die biologische Fitness des Bakteriums.

4.2.2. Die Auswirkungen der gerichteten Mutagenese der ORFs *ub4* und *ub5*

Die Unterbrechung des ORF *ub4* durch VIM in der Mutante *B. japonicum* 4JQ beweist seine symbiotische Relevanz.

Die Nodulierung ist nicht entscheidend gestört, aber die Bakterien sind praktisch nicht zur Besiedlung des inneren Knöllchengewebes befähigt (siehe Abb.41) und das in der Symbiose ausgebildete Wurzelsystem von *Glycine max* bv. Maple Arrow ist dementsprechend Fix⁻. Die extremen Chlorosen der Blätter von *Glycine max* bv. Maple Arrow, die aus der Interaktion mit *B. japonicum* 4JQ resultieren, zeigen, daß sich diese Mutation noch negativer auf die Symbiose auswirkt als die Mutationen in *B. japonicum* 2-10 oder *B. japonicum* fr Δ 24 (siehe Abb.35).

Auch die VIM in ORF *ub5* bewirkt einen Phänotyp der Mutante, der in der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow gestört ist. Die Nodulierung der Pflanze ist deutlich erhöht (siehe Tab.05), die Infizierung der Knöllchen ist dagegen verschlechtert, verglichen mit dem WT (siehe Abb.42). Allerdings sind die negativen Auswirkungen auf die Besiedlung und Stickstoff-Fixierung nicht größer als sie bei der Mutante *B. japonicum* 911 beobachtet werden, in der keine Unterbrechung eines ORFs durch die VIM herbeigeführt worden ist, der Vektor allerdings upstream von *ub12* in das Genom integriert ist (siehe Abb.43).

Sowohl die Mutante *B. japonicum* 911 als auch die Mutante *B. japonicum* 1011 zeigen einen symbiotischen Phänotyp im Zusammenleben mit *Glycine max* bv. Maple Arrow, obwohl aufgrund der inserierten DNA-Fragmente, die keinen ORF unterbrechen und auch die jeweiligen upstream DNA-Regionen umfassen, keine phänotypischen Veränderungen von *B. japonicum* 110*spc4* erwartet werden. Darüberhinaus ist die Mutante *B. japonicum* 911 stärker in der Infizierung der Pflanzenzellen beeinträchtigt als *B. japonicum* 1011, obwohl in beiden Mutanten keine Unterbrechung eines ORFs stattfindet (siehe Abb.43).

und Abb.44). In *B. japonicum* 1011 ist allerdings die Insertion des Vektors an einer anderen Position und der Orf *ub5* liegt in einer zusätzlichen Kopie vor.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß nicht nur das Vorhandensein der intakten ORFs von Bedeutung ist, sondern auch die genetische Organisation dieser DNA-Region.

4.2.3. Das symbioserelevante Gen *intA* in *B. japonicum* 110*spc4*

Die Rekombinasen der Int Familie sind nach dem Int Protein des Phagen λ benannt und katalysieren die Verbindung unterschiedlicher biologischer Systeme (Nash, 1996).

Über die allgemeinen Sequenzähnlichkeiten hinaus, die auf ein Integrase Gen hindeuten, können in *intA* von *B. japonicum* 110*spc4* auch die konservierten Regionen PatchI-III sowie BoxA-C identifiziert werden, die für funktionelle Rekombinasen der Int Familie vorausgesetzt werden (Nunes-Düby *et al.*, 1998; Van Mellaert *et al.*, 1998).

Die über das NCBI einzusehende Datenbank konservierter Domänen zeigt auf, daß das potentielle Genprodukt IntA zur Familie der Phagen Integrase zu zählen ist (nach der "NCBI Conserved Domain Search" auf der homepage des NCBI im world wide web).

Anhand dieser computergestützten Analysen, kombiniert mit den Ergebnissen der VIM von *intA* in *B. japonicum* 110*spc4*, kann postuliert werden, daß es sich bei dem ORF *intA* um ein Gen handelt.

Der horizontale Gen-Transfer der ca. 500 kb langen symbiotischen Insel in *Mesorhizobium loti* wird durch eine solche phagenverwandte Integrase katalysiert, die nahe einem Ende symbiotischen Insel codiert ist. Die Integration erfolgt in ein *phe*-tRNA Gen des Rezipienten-Stammes, der dadurch die Fähigkeit zur Ausbildung einer effektiven Symbiose erlangt. Dieser symbiotische Gentransfer wird als wichtiger Faktor während der Evolution der Symbiose diskutiert (Sullivan *et al.*, 1998).

Die *nod* Genotypen sind besonders gut für einen horizontalen Gentransfer geeignet, aufgrund ihrer Lokalisierung auf übertragbaren Plasmiden oder in einer sogenannten "symbiotischen Region" (Mergaert *et al.*, 1997).

Untersuchungen an Freiland-Populationen von *Mesorhizobium loti* lassen den Schluß zu, daß die Diversität symbiotisch aktiver Stämme auf den horizontalen Transfer chromosomaler symbiotischer Gene von symbiotisch aktiven Stämmen zu symbiotisch inaktiven Stämmen zurückzuführen ist (Sullivan *et al.*, 1995), sowie auch bereits

horizontalen Transfer und Rekombination von symbiotischen Plasmiden in Populationen verschiedener *Rhizobium* Spezies dokumentiert worden ist (Schofield *et al.*, 1987; Young *et al.*, 1988; Laguerre *et al.*, 1992).

Dies beweist den indirekten Effekt der Integrasen für die Symbiose, sie ermöglichen die Weitergabe von Informationen, die symbiotisch inaktive Rhizobien zur Ausbildung einer effektiven Symbiose mit Fabaceen befähigt.

Abgesehen von dieser indirekten Funktion ist in anderen Systemen bereits eine direkte Wirkung von Integrasen in der Interaktion von Eubakterien mit Pflanzen nachgewiesen worden.

Das Integrase Gen *sss* des Biokontroll-Stammes *Pseudomonas fluorescens* WCS365, das signifikante Homologie zu *intA* in *B. japonicum* 110*spc4* zeigt (siehe 3.4.5., Tab.02B), ist für eine erfolgreiche Infektion der Wurzelhaare von Kartoffel- und Tomatenpflanzen essentiell (Dekkers *et al.*, 1998; Dekkers *et al.*, 2000). Damit ist eine Integrase identifiziert worden, die an der Besiedlung von Pflanzenwurzeln durch Bakterien, die das Pflanzenwachstum verbessern, entscheidend beteiligt ist, denn eine verringerte Kolonisierung der Pflanzenwurzel resultiert in einer verschlechterten Biokontroll Aktivität (Schippers *et al.*, 1987).

Auch in *Pseudomonas aeruginosa* kann eine verringerte Fähigkeit zur Wurzelbesiedlung beobachtet werden, die aus einer Mutation in *sss* resultiert. Darüberhinaus geht die Mutation mit einer Veränderung in der Pyoverdine-Induktion und verwandten Proteinen der äußeren Membran einher (Höfte *et al.*, 1994), sie hat also weiterreichende Auswirkungen auf die Zelle.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß das Integrase Gen *intA* in *B. japonicum* 110*spc4* für die Ausbildung einer effektiven Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow relevant ist (siehe 3.5.).

Die Unterbrechung des 388 AS langen potentiellen Genproduktes IntA mittels VIM bei N-184 in *B. japonicum* HE-1 bewirkt eine verringerte Nodulierung, eine stark reduzierte Infektion der Pflanzenzellen und einen Fix⁻ Phänotyp von *Glycine max* bv. Maple Arrow.

Die Unterbrechung von IntA bei I-356 in der Mutante *B. japonicum* EV-3 ermöglicht die Synthese eines Proteins, das über 90 % des vollständigen Genproduktes umfaßt. Die negativen Auswirkungen auf die Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow sind in dieser Mutante entsprechend deutlich geringer. Die Nodulierung entspricht der des WT, die Infektion ist im Vergleich zum WT reduziert aber wesentlich stärker ausgeprägt als bei *B.*

japonicum EH-1, und es ist eine symbiotische Nitrogenase-Aktivität (ca. 10 % der Aktivität des WT) detektierbar.

Damit kann gezeigt werden, daß *intA* in *B. japonicum* 110*spc4* ein symbioserelevantes Gen darstellt, das vermutlich eine funktionelle Integrase codiert.

Es kann vermutet werden, daß Integrasen bei Rhizobien, außer ihrer Funktion in der Evolution und bei der Weitergabe genetischer Information, auch direkt an der Interaktion mit der Wirtspflanze beteiligt sind und eine entscheidende Rolle bei der Besiedlung des Wirtsgewebes spielen.

4.2.4. Die genetische Organisation in der untersuchten DNA-Region

Die Versuche haben eindeutig ergeben, daß die untersuchte DNA-Region in *B. japonicum* 110*spc4* für die Ausbildung einer effektiven Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow notwendig ist und die verschiedenen ORFs unterschiedliche Einflüsse auf diese Endosymbiose haben.

Desweiteren haben die gerichteten Mutagenesen, die keine Unterbrechung von ORFs oder möglichen Operons herbeiführen, die Notwendigkeit weiterer regulatorischer Mechanismen aufgedeckt. Bekannte genotypische Faktoren, die den Phänotyp des Bakteriums beeinflussen können, sind unter anderem die Topologie der ORFs zueinander, die Kopienzahl der ORFs und die DNA-Organisation, oft einhergehend mit Regulationen auf der mRNA-Ebene (Ohman *et al.*, 1991; Volff *et al.*, 1997; Kolb *et al.*, 2001).

Die phänotypischen Auswirkungen einer VIM in dem den C-Terminus codierenden Bereich von *intA* sind wesentlich schwächer ausgebildet als die der Mutation innerhalb von *ub12*. Dies läßt den Schluß zu, daß die ORFs *intA* und *ub12* nicht in einem gemeinsamen Operon vorliegen. Im Fall der Expression des ORF *ub3* würde auch dessen Lokalisierung auf dem Gegenstrang zwischen *intA* und *ub12* diese Vermutung unterstützen.

Der Stamm *B. japonicum* bv Δ , in dessen Genom eine VIM zwischen *ub12* und *ub4* eingeführt ist, ist in der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow relativ gering beeinträchtigt (siehe Abb.40). Die VIM in *ub4* hat dagegen eine wesentlich stärkere Beeinträchtigung der symbiotischen Interaktionen zur Folge (siehe Abb.41). Daher ist eine Kopplung dieser beiden ORFs in einem Operon unwahrscheinlich.

Die Frage, ob *ub4* und *ub5* in einem Operon zusammen reguliert werden, kann basierend auf den durchgeführten Untersuchungen nicht beantwortet werden, die Phänotypen der Vektorintegrationsmutanten *B. japonicum* 4JQ und *B. japonicum* 5JQ schließen ein solches Operon keineswegs aus.

Auf den sequenzierten 1750 bp des Hinstrang, downstream von ORF *ub5*, ist kein weiterer ORF identifiziert worden; der ORF *pipA* ist auf dem Gegenstrang codiert (siehe Abb.23 und Abb.65). Dies impliziert, daß ein mögliches Operon, das *ub4* und *ub5* umfassen könnte, spätestens nach dem ORF *ub5* endet.

4.2.5. Die Topologie der abgeleiteten Genprodukte

Über die mögliche Topologie der potentiellen Genprodukte können Aussagen getroffen werden, die allerdings rein auf *in silico* Analysen beruhen.

Ausnahme ist PipA, das aufgrund eindeutiger Sequenz-Ähnlichkeiten der uncharakterisierten Proteinfamilie UPF0114 zugeordnet wird (nach der "NCBI Conserved Domain Search" auf der homepage des NCBI im world wide web; Abb.66).

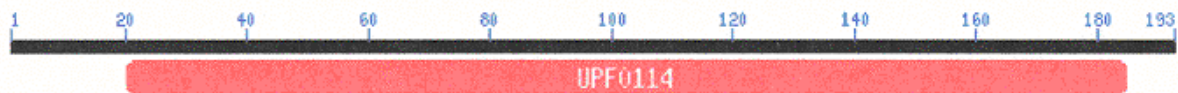


Abb.66: Graphische Darstellung der Übereinstimmung der abgeleiteten AS-Sequenz von PipA aus *B. japonicum* 110spc4 mit der Proteinfamilie UPF0114. Der rote Balken symbolisiert den konservierten Bereich der Proteinfamilie UPF0114, der signifikante Ähnlichkeiten mit PipA aufweist.

Erstellt mittels der "NCBI Conserved Domain Search" auf der homepage des NCBI im world wide web.

Den computergestützten Analysen zufolge ist PipA über vier transmembrane Helices in der Membran verankert. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Daten von der Proteinfamilie UPF0114. Es können allerdings noch keine Aussagen bezüglich der exakten Lokalisierung der Domänen von PipA relativ zum Cytoplasma gemacht werden, da die Helices sowohl von innen nach aussen als auch gleichermassen umgekehrt verlaufen können (siehe Abb.24).

In Ub12 gibt es eine potentielle transmembrane α -Helix, die laut der PROSITE Datenbank (nutzbar über das world wide web unter der Adresse expasy.ch/prosite) als außen-innen Helix (49-68) oder innen-außen Helix (49-65) vorliegen kann (siehe Abb.46).

Die Expression einer aktiven alkalischen Phosphatase von dem Reporter gen *phoA* in *B. japonicum* 2-10 deutet auf eine innen-außen Helix hin. Kombiniert mit der C-terminal lokalisierten potentiellen Membran-angelernten Domäne formt Ub12 so einen periplasmatischen loop (siehe Abb.46).

Die Lokalisierung der potentiellen Phosphorylierungs- und Myristilierungsstellen in Ub12 unterstützt die Vermutung eines gemeinsamen Genproduktes und die Lokalisierung relativ zur Cytoplasmamembran.

Auch für Ub5 wird eine Verankerung in der Cytoplasmamembran vorausgesagt, die über eine N-terminale und eine C-terminale transmembrane Domäne erfolgt, bei den Domänen handelt es sich aber laut Computer-Analyse nicht um Helices.

Die potentiellen Genprodukte Ub3, Ub4 und IntA werden als cytoplasmatisch vorausgesagt.

4.3. Der Einfluß von Selen auf die Entwicklung von *B. japonicum* 110spc4

Der genetische Code innerhalb der biologischen Systeme wurde anfänglich als universell angesehen (Barell *et al.*, 1979), es sind jedoch in den letzten zwei Jahrzehnten einige Veränderungen identifiziert worden, die sich im Laufe der Evolution ausgebildet haben (Osawa *et al.*, 1992; Jukes *et al.*, 1993). So wird beispielsweise in *Candida cylindracea* das Codon CUG als Serin anstatt als Leucin translatiert (Yokogawa *et al.*, 1992), in Mitochondrien kann an Stelle des Stoppcodons UAA die Aminosäure Tyrosin in das Genprodukt eingebaut werden und das Methionin-Codon AUA kodiert in einigen Fällen die Aminosäure Isoleucin (Bessho *et al.*, 1992).

Eine weitere Veränderung des genetischen Codes, die mittlerweile im Tierreich, bei Archaeobakterien und bei Eubakterien identifiziert worden ist, ist der cotranslationale Einbau von Selenocystein, bezeichnet als die 21. Aminosäure (Böck *et al.*, 1991). Die Insertion in das Protein findet an einem UGA Codon der mRNA statt, das im Standardcode einen Translationsstop codiert, und ist in allen bekannten Fällen an eine stem-loop Struktur gekoppelt, die bei Eubakterien direkt downstream auf das UGA Codon folgt und mit dem Translationsfaktor SelB, GTP und der Selenocysteyl-tRNA einen quarternären Komplex bildet. Dieser Komplex bewirkt im Zusammenspiel mit dem translatierenden Ribosom die Insertion von Selenocystein (Baron *et al.*, 1993; Hüttenhofer *et al.*, 1998) (Abb.67).

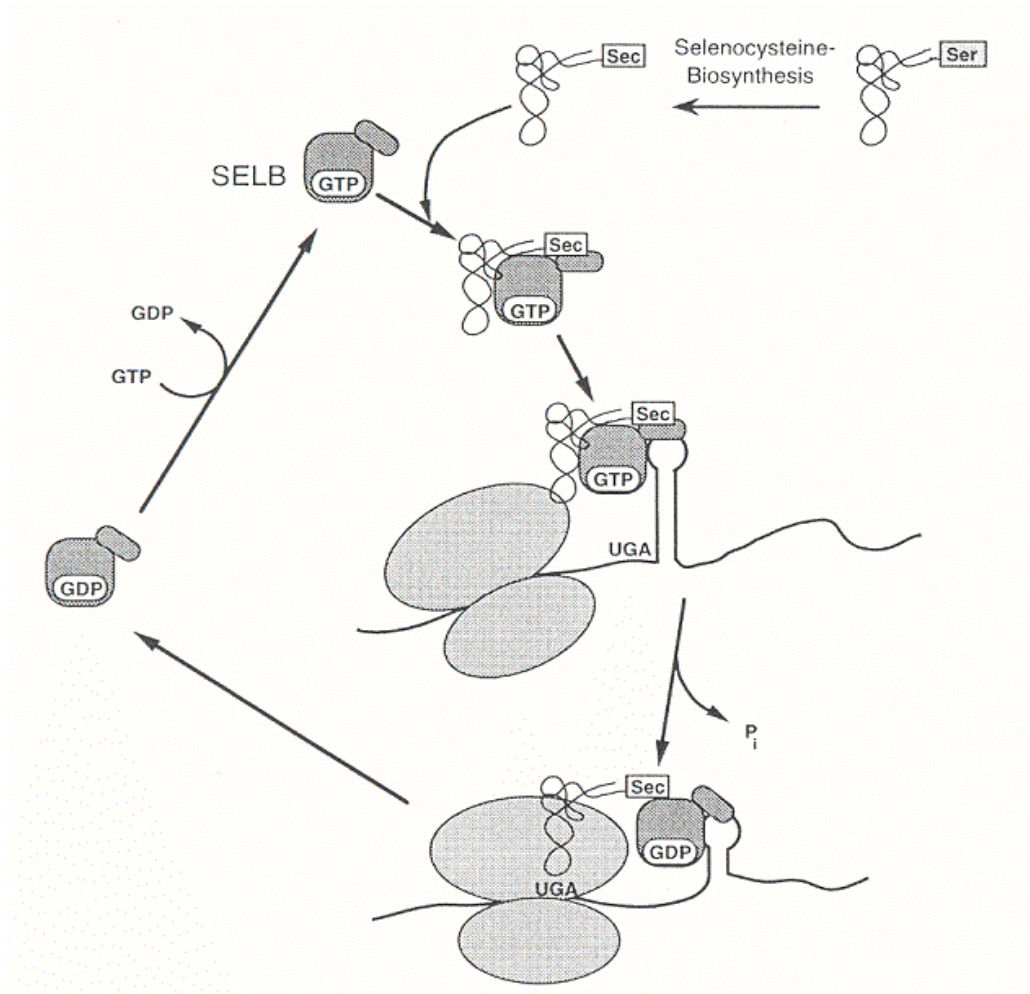


Abb.67: Modell für die cotranslationale Insertion von Selenocystein (Sec) in Proteine in *E. coli* (aus Hüttenhofer *et al.*, 1998).

4.3.1. Das Wachstum von *B. japonicum* 110*spc4* und *B. japonicum* 2-10

Die Anzucht in definierten Medien wie 20N, 20H und High K⁺ (in denen kein zugegebenes Selen enthalten ist) zeigt, daß Selen-freies Medium ohne spezielle hochreine Komponenten nicht realisierbar ist, aufgrund des ubiquitären Vorkommens von Selen als Verunreinigung des Schwefels. Daß Selen unter diesen freilebenden Bedingungen nicht für das Wachstum von *B. japonicum* benötigt wird, ist eher unwahrscheinlich, da es als essentielles Spurenelement anderer Bakterien bekannt ist (Pinsent, 1954). Die zusätzliche Zugabe von Selen (bis 5 µM) in das Anzuchtmedium bewirkt keine Veränderung im Wachstum von *B. japonicum* 110*spc4* (Daten nicht dargestellt).

Im Pflanzentest mit *Glycine max* bv. Maple Arrow enthält die Leguminosen Nährlösung zwar auch kein definiert zugegebenes Selen, aber über das zur Anzucht der Bakterien verwendete Komplexmedium 20E kann genauso ein Eintrag von Selen erfolgen wie über die Bodenkolloide bzw. Verschmutzungen durch Staub und ähnliches.

Weder *B. japonicum* 110*spc4* noch die Mutante *B. japonicum* 2-10 sind bei den untersuchten Versuchsbedingungen auf definiert zugegebenes Selen angewiesen.

Ob es sich bei der von Boursier und Kollegen (1988) in *B. japonicum* identifizierten Selen-abhängigen Hydrogenase wirklich um ein Selenoprotein handelt, ist eher fraglich, da das Gen kein *in frame* TGA Codon enthält, was aber nach derzeitigem Wissen für einen Selenocystein-Einbau in eubakterielle Proteine vorausgesetzt wird (Stadtman, 1996).

Es ist kein Autoradiogramm von dem Gesamtprotein erstellt worden, bei dem Signal des isolierten und gereinigten Enzyms kann es sich genauso um eine unspezifische Inkorporation handeln, da keine Referenz in der Auftrennung enthalten ist.

Allerdings ist in *Desulfomicrobium baculatum* mit HydV ein Selenoprotein charakterisiert worden, das die große Untereinheit einer periplasmatischen Hydrogenase darstellt (Tormay *et al.*, 1997).

Davon abgesehen wird in den Analysen von Boursier festgestellt, daß Selen unter den angelegten anaeroben Bedingungen einen klaren Einfluß auf das Wachstum und die Stoffwechselvorgänge von *B. japonicum* hat.

4.3.2. Der Selenocystein Biosyntheseapparat in Rhizobien

Das Überlesen des TGA Codons von *B. japonicum* 110*spc4* in *E. coli* gibt Anlaß zu der Vermutung, daß die Selenocystein Biosynthese Apparate der beiden Organismen zumindestens zu einem gewissen Teil kompatibel sind.

Um die Homologen der *sel* Gene von *E. coli* in *B. japonicum* 110*spc4* zu identifizieren, sind aus diesem Grund DNA-Sonden aus den *sel* Genen von *E. coli* hergestellt und für die Southern-Hybridisierung eingesetzt worden.

Ein DNA-Bereich mit Sequenzähnlichkeit zu *selA* ist auf diesem Weg markiert worden, die Suche nach *selB* und *selD* hat allerdings kein Ergebnis geliefert (siehe Abb.51).

Dies bedeutet jedoch nicht, daß diese Gene nicht vorhanden sind. In dem total sequenzierten Genom von *Sinorhizobium meliloti* sind Gene mit eindeutiger Sequenzähnlichkeit zu *selA*, *selB* und *selD* innerhalb von 12 kb auf dem Symplasmid pSyma identifiziert worden (<http://www.sequence.toulouse.infra.fr>). Auch im Genom von *Mesorhizobium loti* liegt ein als *selA* identifizierter ORF auf dem Chromosom vor (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>), die anderen *sel* Gene sind evtl. auch vorhanden, aber es werden keine Ähnlichkeiten angezeigt. So könnte *selB* beispielsweise derzeit noch als Gen eines normalen Transkriptionsfaktors in der Datenbank geführt werden. Darüberhinaus enthält *Mesorhizobium loti* den ORF mll3944, der Ähnlichkeit zu dem Selenoprotein W zeigt.

In dem Genom des *Bradyrhizobium japonicum* Stammes 438 ist ein ORF vorhanden, der eindeutige Ähnlichkeiten zu Selenocystein-Lyasen hat (P. Müller, persönliche Mitteilung). Die Selenocystein-Lyasen katalysieren den Abbau von Selenocystein zu L-Alanin und H₂Se (Esaki *et al.*, 1982; Chocat *et al.*, 1983), wobei als Zwischenprodukt elementares Selen auftritt, das nicht-enzymatisch zu H₂Se reduziert wird (Esaki *et al.*, 1985).

Zusammengefaßt geben diese Daten Grund zu der Annahme, daß Selen und Selenoproteine in Rhizobien - und speziell in *B. japonicum* 110*spc4* - eine Rolle spielen.

4.3.3. Das potentielle Selen bindende Protein Sbp scheint symbioserelevant

Das in *B. japonicum* 110*spc4* sequenzierte DNA-Fragment zeigt im Datenbank-Abgleich (Datenbanken des NCBI) eindeutige Ähnlichkeit in der Sequenz mit *sbp*, dem Gen für ein konserviertes Selen bindendes Protein, aus verschiedenen Organismen (siehe Abb.53). In Eubakterien ist *sbp* allerdings bis dato noch nicht beschrieben worden.

Die VIM in *sbp* aus *B. japonicum* 110*spc4*, resultierend in der Mutante *B. japonicum* *sbp*Δ-1, beweist die Relevanz dieses DNA-Bereiches für die Besiedlung der Zellen des inneren Knöllchengewebes und die Stickstoff-Fixierung in der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow (siehe Abb.55).

Bei dem konservierten Selen bindenden Protein Sbp handelt es sich um ein cytoplasmatisches Protein, dessen physiologische Funktion noch ungeklärt ist (Ishida *et al.*, 2002).

Das in *Lotus japonicus* isolierte und charakterisierte Gen *Ljsbp*, das über 50 % Übereinstimmung mit der abgeleiteten AS-Sequenz aus *B. japonicum* 110*spc4* hat, wird in der Pflanze vorrangig in den Knöllchen und den Keimlingen transkribiert (Flemetakis *et*

al., 2002). Eine Anreicherung des ca. 60 kDa großen Proteins kann in den Wurzelhaaren und der Wurzelepidermis über dem Knöllchen-Primordium lokalisiert werden (Flemetakis *et al.*, 2002).

Es ist bereits gezeigt worden, daß Selen (in meßbaren Konzentrationen) für das Wachstum von Luzerne und Klee in hydroponischer Kultur nicht relevant ist (Terry *et al.*, 2000). Die beschriebene Expression von Sbp in symbiosespezifischen Geweben der Leguminosen (s.o.) lassen allerdings auf den Bedarf von Selen in der Symbiose schließen. Basierend auf den Gegebenheiten innerhalb des pflanzlichen Partners, ist eine mögliche Erklärung für Vorkommen und symbiotische Relevanz von *sbp* in *B. japonicum* 110*spc4* eine Konkurrenz um das Spurenelement Selen. *B. japonicum* 110*spc4* ist evtl. nur unter symbiotischen Bedingungen auf Selen angewiesen, eine Vermutung, die durch die unspezifische Inkorporation von Selen unter freilebenden Wachstumsbedingungen unterstützt wird. Damit wäre ein dem pflanzlichen Sbp ähnliches Protein für den Mikrosymbionten unter freilebenden Bedingungen entbehrlich, in der Interaktion hingegen von großem Nutzen, wie die Analyse der Mutante *B. japonicum* *sbp*Δ1 vermuten läßt sogar notwendig.

4.3.4. Die unspezifische Inkorporation von Selen in *B. japonicum* 110*spc4*

Weder in *B. japonicum* 110*spc4* noch in der Mutante *B. japonicum* 2-10 ist unter den angelegten Versuchsbedingungen ein spezifischer Einbau von Selen in das Proteom beobachtet worden. In allen Fällen erfolgt ein unspezifischer Einbau des Radioisotopes [⁷⁵Se], das für die Identifizierung von Selenoproteinen eingesetzt wird, d.h. das Selen wird statistisch verteilt an Stelle des Schwefels über die Schwefel-haltigen Aminosäuren (Cystein und Methionin) in das Proteom integriert (siehe Abb.60).

Ein solcher unspezifischer Einbau von Selen kann auch in dem Modellorganismus *E. coli* beobachtet werden, er ist allerdings durch die Zugabe von Cystein zum Medium unterdrückbar, da die Zellen dann nicht mehr auf die Aufnahme von Schwefel für die Neusynthese von Cystein angewiesen sind (Müller *et al.*, 1997; siehe Abb.59).

Weder Cystein noch Methionin im Medium „quenchen“ (unterdrücken) den Einbau von Schwefel über die Aminosäure-Biosynthese, bzw. die Neusynthese von Methionin und Cystein und daran gekoppelt den unspezifischen Einbau von Selen anstelle von Schwefel, in *B. japonicum* 110*spc4*.

Eine mögliche Erklärung wäre, daß *B. japonicum* 110*spc4* nicht über Selenoproteine verfügt und daher nicht zwischen Schwefel und Selen differenzieren muß, was allerdings, basierend auf den anderen Beobachtungen, unwahrscheinlich erscheint.

Da Selen unter natürlichen Gegebenheiten in so geringem Maß vorliegt, besteht auch die Möglichkeit, daß der unspezifische Einbau für die Zelle vernachlässigbar ist und dennoch parallel ein spezifischer Einbau stattfindet, der im Autoradiogramm allerdings von dem unspezifischen Einbau überdeckt wird. Auch die Einbau-Enzyme des Schwefel-Stoffwechsels können einen verstärkten unspezifischen Einbau von Selen verursachen, indem sie den Einbau von Selen bevorzugen und damit eine erhöhte Selen-Konzentration in einem erhöhten Einbau von Selen über O-Acetylserin und die tRNA in Proteine resultieren. Um dies zu analysieren, müßten die K_m - K_{kat} Werte der Enzyme verglichen werden.

Andererseits kann es sich bei den (angenommenen) Selenoproteinen von *B. japonicum* 110*spc4* um Enzyme handeln, die nur unter spezifischen Bedingungen benötigt und entsprechend exprimiert werden. Solche Umstände liegen auch in *E. coli* vor, wo die *sel* Gene allein unter anaeroben Wachstumsbedingungen exprimiert werden, abgesehen von *fdhO*, das alleine unter aeroben Bedingungen exprimiert wird (Sawers *et al.*, 1991). In diesem Fall kann man davon ausgehen, daß die Expression der Selenoproteine in *B. japonicum* 110*spc4* direkt induziert oder an spezifische Signale bzw. äußere Einflüsse gekoppelt ist, wie es für verschiedenste andere Gene bereits beschrieben ist (Fischer, 1996; Oke *et al.*, 1999).

4.4. Das Überlesen des TGA Codons von *ub12* in *E. coli* deutet auf eine cotranslationale Insertion von Selenocystein hin

Durch die Expression eines gemeinsamen Genproduktes in *E. coli* M15 und die Studien in *B. japonicum* kann gezeigt werden, daß ein Überlesen des *in frame* TGA Codons von *ub12* aus *B. japonicum* 110*spc4* stattfindet, resultierend in der Synthese von Ub12 (siehe Abb.50).

Bei der Auswertung der Reportergen-Fusionen und dem Vergleich mit den Expressionsstudien bleibt allerdings zu beachten, daß die Expression in *E. coli* M15 nicht direkt mit der in *E. coli* DH5 α verglichen werden kann. Erfahrungen haben gezeigt, daß die Genexpression auch in äußerst ähnlichen Laborstämmen von *E. coli* sehr unterschiedlich verlaufen kann (D. Borthakur, persönliche Mitteilung).

4.4.1. Ausschluß anderer Mechanismen der TGA Suppression aufgrund der Gegebenheiten in *B. japonicum* 110*spc4*

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf die Expression eines gemeinsamen Genproduktes von *ub1* und *ub2* aus *B. japonicum* 110*spc4* hin, der Synthese von Ub12.

Dafür ist allerdings ein Überlesen des in *ub12 in frame* vorliegenden TGA Codons vorauszusetzen, das ansonsten einen Translationsstopp codiert.

Eine solche UGA-Suppression kann auf einer Reihe verschiedener bekannter Mechanismen beruhen, der Vergleich der Gegebenheiten in *ub12* mit den beschriebenen Voraussetzungen dieser Mechanismen, ermöglicht alle bis auf einen auszuschließen.

Cotranslationaler Einbau von Tryptophan an Stelle des UGA Codons:

Der genetische Kontext des untersuchten TGA Codons in *ub12* erfüllt nicht die Bedingungen für einen cotranslationalen Einbau von Tryptophan, wie sie von Miller (1983) und Engelberg-Kulka (1981) beschrieben wurden. In der abgeleiteten mRNA von *ub12* folgt in 3'-Richtung auf das UGA Codon kein A sondern ein U.

Eine fehlende Methylierung der tRNA:

Die Enzymaktivität der tRNA Methylase, die für eine UGA-Suppression verantwortlich sein kann, ist nicht analysiert worden. Es kann allerdings gezeigt werden, daß *B. japonicum* 110*spc4* auch bei Anwesenheit von 0,4 mM Adenin im Medium nicht im Wachstum gehemmt wird (Daten nicht dargestellt). Diese Unterdrückung des Wachstums durch Purine und Purin Nukleoside, die bei Bakterien beobachtet wird, die in der beschriebenen Methylase mutiert sind (Dalal *et al.*, 1966; Reeves *et al.*, 1975), findet in *B. japonicum* 110*spc4* nicht statt. Damit kann dieser Mechanismus nach derzeitigem Wissen ausgeschlossen werden. Darüberhinaus finden die RGF Tests in *E. coli* statt, hier spielt diese Möglichkeit keine Rolle.

Eine Veränderung des Leserahmens vor dem Erreichen des UGA Codons:

Ein solcher *frameshift* vor dem TGA Codon würde darin resultieren, daß das *'phoA* Gen in *B. japonicum* 2-10 nicht mehr in dem exprimierten Leserahmen läge. Da eine Aktivität der alkalischen Phosphatase auf die Expression von *phoA* schließen läßt, kann ein *frameshift* als Mechanismus der TGA-Suppression in diesem Fall nicht angenommen

werden. Das gleiche gilt für die Reporter-gen-Fusionen in *E. coli*, bei denen ein *frameshift* aufgrund der meßbaren β -Galactosidase-Aktivität ausgeschlossen werden kann.

Darüberhinaus stimmen die genotypischen Voraussetzungen nicht mit den Umständen überein, wie sie in der Literatur für einen solchen Vorgang gefordert werden (Weiss *et al.*, 1988). Eine Limitierung der Aminoacyl-tRNA, die eine Änderung des Leserahmens an einem hungrigen Codon wie z.B. AAG bewirkt, kann in diesem Bereich nicht beobachtet werden.

Kopplung und Export über ein Twin-Arginin Motiv:

Für eine posttranslationale Kopplung von Genprodukten, die in Abhängigkeit von dem TAT (Twin-Arginin-Translocation) System erfolgt, werden AS Konsensus Sequenzen beschrieben (Sambasivarao *et al.*, 2000; Voordouw, 2000). Die N-Termini der potentiellen Genprodukte *ub1* und *ub2* weisen keinen Bereich auf, der den in diesen Publikationen vorgeschlagenen Twin-Arginin Motiven (S/T-**R-R**-X-F-L-K bzw. S-R-**R-R**-F-L-A bzw. T-P-**R-R**-A-T-A) oder denen der Rieske Proteine innerhalb der Rhizobien (P/H-T-**R-R**-D-F-L-F/Y-V/L-A/T-T) entspricht (Meloni *et al.*, 2002).

Schon aufgrund dieses Ausschlußverfahrens erscheint der cotranslationale Einbau von Selenocystein an dem *in frame* TGA Codon in *ub12* von *B. japonicum* 110*spc4* plausibel, da die Voraussetzungen für die anderen bekannten Mechanismen einer TGA-Suppression nicht erfüllt werden.

4.4.2. Die Besonderheiten der downstream Region deuten auf eine Sekundärstruktur hin

Schon bei der Sequenzierung zeigt sich eine Auffälligkeit in dem DNA-Bereich downstream des *in frame* TGA Codons in *ub12*, es tritt in den meisten Fällen eine Kompression mehrerer Basen auf, die in dem Bereich der minimalen SECIS liegen (bp 3126-3133 der in 3.4.4. angegebenen DNA-Sequenz), egal welcher Strang und mit welchen Primern sequenziert wird. Nur in Ausnahmefällen kann die Basenfolge dieses Bereichs eindeutig identifiziert werden. Dies deutet auf eine Sekundärstruktur hin, die die Migration im Gel behindert. Wenn die neu synthetisierte DNA während der Elektrophorese eine Sekundärstruktur ausbildet, kommt es zu anomaler Migration im Gel, was zu ungleichen Bandenabständen, fehlenden Banden oder Banden an derselben

Position in mehreren Bahnen führt (Innis *et al.*, 1988; PromegaCorporation, 1995). Diese Ereignisse treten immer in bestimmten Regionen auf.

Bei der PCR dieses Bereiches für die translationalen Reportergenfusionen (RGF) treten für die verwendeten Polymerasen überdurchschnittlich viele Polymerisationsfehler in dem Bereich der potentiellen stem-loop Struktur auf. Wobei auch hier Sekundärstrukturen auf Ebene der einzelsträngigen DNA auftreten können und die Exaktheit der DNA-Polymerase beeinträchtigen. Verursacht wird dies durch die häufige Dissoziation der DNA-Polymerase von dem DNA-Strang, an einer ausgebildeten Sekundärstruktur (Promega, 1995).

Eine Untersuchung der DNA-Region bzw. der abgeleiteten mRNA-Sequenz downstream des UGA Codons von *ub12* aus *B. japonicum* 110*spc4* und ihr Vergleich mit bekannten Sequenzen von Selenoproteinen aus *E. coli* erlaubt die Vermutung, daß eine stem-loop Struktur in der mRNA ausgebildet wird (siehe Abb.56 und Abb.57).

Die Übereinstimmungen mit den WT Strukturen von *E. coli* sind über die gesamte Sequenz gesehen nicht optimal, was den cotranslationalen Einbau von Selenocystein in Proteine in *E. coli* an einem solchen UGA Codon in den meisten Fällen verringert (Berg *et al.*, 1991; Heider *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1998).

In Abb.68 ist die *ub12* mRNA-Sequenz im Vergleich mit veränderten Strukturen aus *E. coli* abgebildet, die einen wesentlich ungleichmäßigeren Aufbau und deutlich schwächere Bindeenergien aufweisen, aber dennoch in dem Einbau von Selenocystein resultieren. Damit ist die schwächere Bindung innerhalb der stem-loop Struktur kein Argument gegen eine Insertion von Selenocystein bei der Expression von *ub12* in *E. coli*.

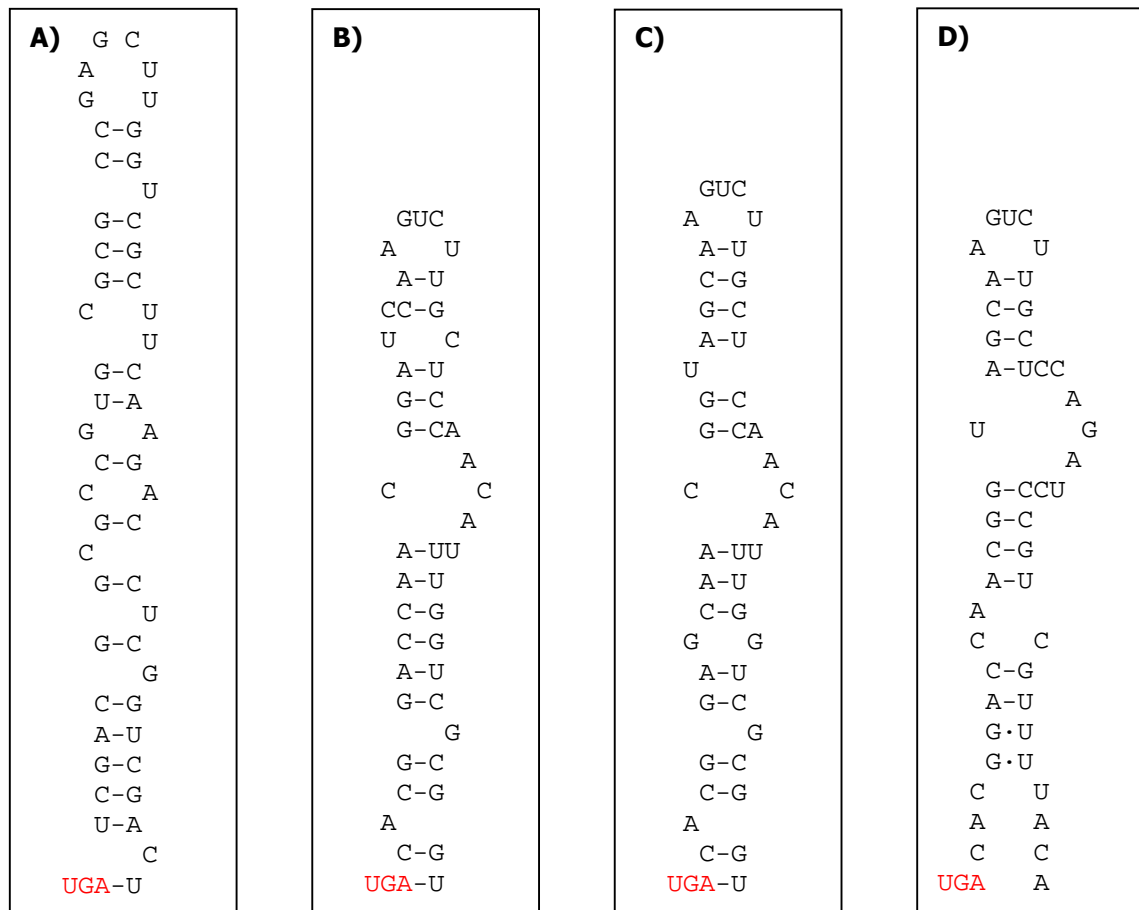


Abb.68: Graphische Darstellung verschiedener potentieller stem loop Strukturen.

Die aus (B) und (C) resultierende cotranslationale Insertion von Selenocystein entspricht der der WT Struktur, die in (D) abgebildete Struktur bewirkt diesbezüglich nur ca. 20 % der Effektivität der WT Struktur (Berg *et al.*, 1991).

A) Region aus *ub12* in *B. japonicum* 110*spc4* ab dem *in frame* UGA Codon, mit einer Bindeenergie von $-9,4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ bei 37°C ($-12,0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ bei 28°C).

B) Derivat von *fdnG* aus *E. coli* mit einer Bindeenergie von $-12,3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$.

C) Derivat von *fdnG* aus *E. coli* mit einer Bindeenergie von $-9,7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$.

D) Derivat von *fdnG* aus *E. coli* mit einer Bindeenergie von $-8,5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Die Übereinstimmungen in den minimalen SECIS, sowohl in der theoretischen graphischen Darstellung als auch in der berechneten optimalen Faltung der mRNA sowie der auftretenden Bindeenergie sind eindeutig (siehe Abb.58).

So erhält man beispielsweise für *ub12* aus *B. japonicum* 110*spc4* und *fdhF* aus *E. coli* sehr ähnliche Anordnungen und mit $-4,8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ zu $4,9 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ eine sehr ähnliche Bindeenergie unter physiologischen Bedingungen in *E. coli*. Die Bindeenergie der SECIS von *fdnG* aus *E. coli* ist mit $-4,2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ sogar deutlich schwächer als die von *ub12*. Auch das unterstützt die Vermutung, daß dieser Bereich bei den Reportergenfusionen in

E. coli wie auch unter natürlichen Bedingungen in *B. japonicum* 110*spc4* in einer cotranslationalen Insertion von Selenocystein resultiert.

Der aus dem stem herausstehende ungebundene Uracil-Rest in der minimalen SECIS von *ub12* ist nicht auf der Seite des stems lokalisiert, wie es in den anderen eubakteriellen Sequenzen der Fall ist und dort als essentiell angesehen wird (Hüttenhofer *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2000). Durch eine abweichende Verdrehung der stem-loop Struktur in der dritten Dimension könnte es aber wiederum richtig lokalisiert werden, sodaß der Expressionsfaktor SelB von *E. coli* ordnungsgemäß binden kann und die Insertion von Selenocystein katalysiert.

In anderen Organismen ist ein auf der "falschen" Seite lokalisierter Uracil-Rest bereits beobachtet worden, wie z.B. bei der Gluthation-Peroxidase von *Homo sapiens*, in deren mRNA das freie U auch auf der dem UGA abgewandten Seite liegt (Ishida *et al.*, 1987).

Die als relevant angesehen Distanz der minimalen SECIS zu dem TGA Codon ist mit 15 bp in *ub12* aus *B. japonicum* 110*spc4* deutlich größer als in *fdhF* (11 bp) oder *fdnG* (10 bp) aus *E. coli*, was die Effektivität des Selenocystein Einbaus zwar deutlich reduziert aber nicht vollständig stoppt (Liu *et al.*, 1998). So ist für die Struktur *fdhF* in *E. coli* gezeigt worden, daß eine Vergrößerung der Distanz um 3 Nucleotide das Überlesen des UGA Codons um ca. 50 % reduziert und selbst bei einem um 6 Nucleotide vergrößerten mRNA-Bereich zwischen UGA und minimaler SECIS eine Selenocystein-Insertion noch mit einer Effektivität von etwa 5 % stattfindet (Liu *et al.*, 1998).

Die Expression von Selenoproteinen in fremden Eubakterien ist bereits beschrieben worden, so ist die Translation eines DNA-Fragmentes mit einem *in frame* TGA Codon aus *Enterobacter aerogenes* als Selenocystein in *E. coli* möglich, wie auch die Expression von *fdhF* aus *E. coli* in *Salmonella typhimurium* (Heider *et al.*, 1991).

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer Selenocystein-Insertion in Ub12 in *E. coli*.

4.4.3. Die Relevanz des downstream Bereiches für das Überlesen von TGA

Die im ONPG-Test (nach Miller) gemessenen Werte der β -Galactosidase Aktivität der RGF-Klone sind nach unterschiedlich langer Inkubationszeit und unter Verwendung verschiedener Medien erzielt worden. Allerdings liegt der Wert von pfr2U2 mit 0,39 U im

Vergleich zu 48,33 U von pUC18 unter 1 %. Die maximalen Werte, die für pUC18 gemessen werden, liegen bei durchschnittlich 87,10 U, die von pfr2U2 ausgehende β -Galactosidase Aktivität liegt in diesen Ansätzen sogar nur bei durchschnittlich 0,07 U.

Die aus Anzuchten der *E. coli* Kulturen in PA-Medium (aerob bei 37 °C) resultierende β -Galactosidase Aktivität von pUC18 im ONPG-Test ist zwar ca. um den Faktor 50 geringer als bei den anderen verwendeten Medien, aber dafür beträgt die von pfr2U2 ausgehende Aktivität unter diesen Bedingungen durchschnittlich ca 23 % des Wertes von pUC18, das Verhältnis ist demnach deutlich zugunsten der Reportergenfusion verschoben (siehe Abb.48).

Die β -Galactosidase Aktivität von pTGA-1 im ONPG-Test erreicht zu keinem Zeitpunkt die Werte von pfr2U2 (Daten nicht dargestellt) Demzufolge belegt bereits dies, daß die Expression einer aktiven β -Galactosidase nicht allein von dem Überlesen des zusätzlichen Startcodons innerhalb der Sequenz von *ub12* ausgehen kann.

Die Unterschiede der Meßergebnisse im ONPG-Test werden zu gering, auch aufgrund der Messungenauigkeit des Photometers. Eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit hat keine Auswirkung auf das Ergebnis (Daten nicht dargestellt). Dieser *in vitro* Test ist demnach nicht ausreichend, um das Überlesen des TGA Codons von *ub12* aus *B. japonicum* 110*spc4* in *E. coli* zu analysieren.

Die ersten Hinweise, das Testsystem bezüglich der Inkubationszeit zu adaptieren, liefert die Anzucht auf X-Gal haltigen Agarplatten, die entstehende Blaufärbung der verschiedenen Klone ist unterschiedlich stark und die Unterschiede sind reproduzierbar (Abb.69).

Basierend auf diesen Beobachtungen wird ein *in vivo* Test mit Flüssigkulturen in PA-Medium durchgeführt. PA-Medium wird verwendet, weil es im ONPG-Test das beste relative Ergebnis der translationalen Reportergenfusionen geliefert hat (s.o.). Durch die Umsetzung des Farbsubstrates X-Gal *in vivo*, kann die Halbwertszeit der β -Galactosidase außer Acht gelassen werden. Enzyme werden in der Zelle nicht nur synthetisiert sondern auch wieder abgebaut (z.B. Wolfe, 1993), das entstehende Farbsubstrat dagegen ist unlöslich und bleibt im umgebenden Medium vorhanden (Horwitz *et al.*, 1966). Der Farbstoff reichert sich also stetig an, während die Enzymaktivität einen gewissen *status quo* nicht überschreitet .

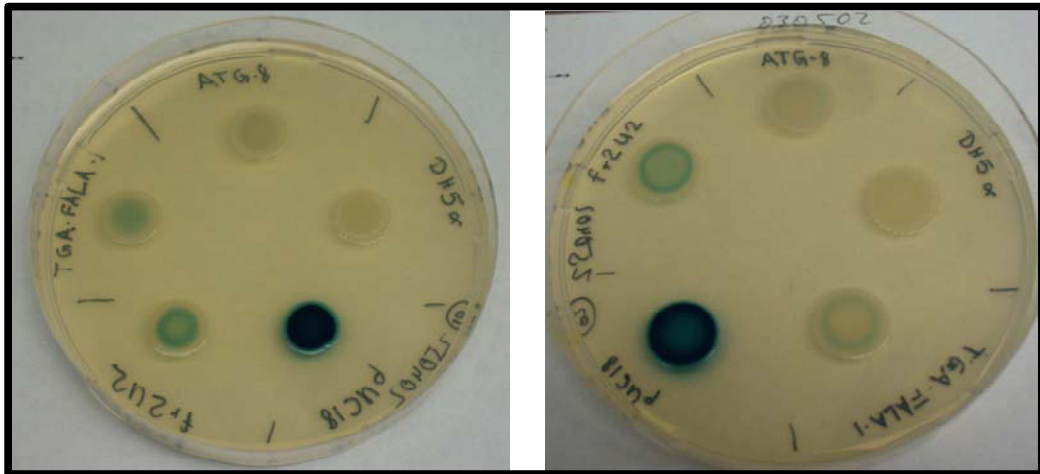


Abb.69: Photographische Darstellung der *E. coli* Klone mit verschiedenen Reportergenfusionen auf entsprechenden Hybridplasmiden. Die Dokumentation erfolgt nach Inkubation für 24 h bei 37 °C und 14 d bei RT. Die Bezeichnungen betreffen die enthaltenen Hybridplasmide (TGA-FALA-1 = TGA-1).

Dieser jeweils über 15 d andauernde *in vivo* Test liefert den gesuchten Nachweis über die Relevanz der downstream des TGA Codons lokalisierten DNA-Sequenz (siehe Tab.07 und Abb.63).

Das Hybridplasmid pATG-8, das das TGA Codon und 188 bp der downstream Region von *ub12* aus *B. japonicum* 110*spc4* trägt, bewirkt die Expression einer aktiven β -Galactosidase in *E. coli* DH5 α . Damit ist bewiesen, daß es zu einem Überlesen des *in frame* TGA Codons von *B. japonicum* 110*spc4* in *E. coli* kommt.

Die durchschnittliche β -Galactosidase Aktivität, die aus den Hybridplasmiden p Δ FR50 und p Δ FR20 resultiert, liegt im Bereich des Ausgangsstammes *E. coli* DH5 α . Die Inserts dieser Klone enthalten nur 50 bp bzw. 20 bp der downstream des TGA lokalisierten DNA-Sequenz von *ub12*. Diese Kontrollen belegen eindeutig, daß der downstream des UGA Codons befindliche Bereich der mRNA für ein Überlesen von UGA essentiell ist.

Darüberhinaus kann gezeigt werden, daß auch die Sequenz dieses downstream Fragmentes relevant für das Überlesen des TGA Codons aus *ub12* in *E. coli* ist.

Zum Nachweis dient das Reportergen-Konstrukt pATG-1, das pATG-8 entspricht, bis auf vier Basenaustausche in der potentiellen stem-loop Struktur (siehe Abb.61). Die aus dem Hybridplasmid pATG-1 resultierende β -Galactosidase Aktivität ist mit 9,4 U_x etwa viermal so hoch wie die aus pATG-8 resultierende Aktivität von 2,26 U_x (Abb.70; siehe Abb.63).

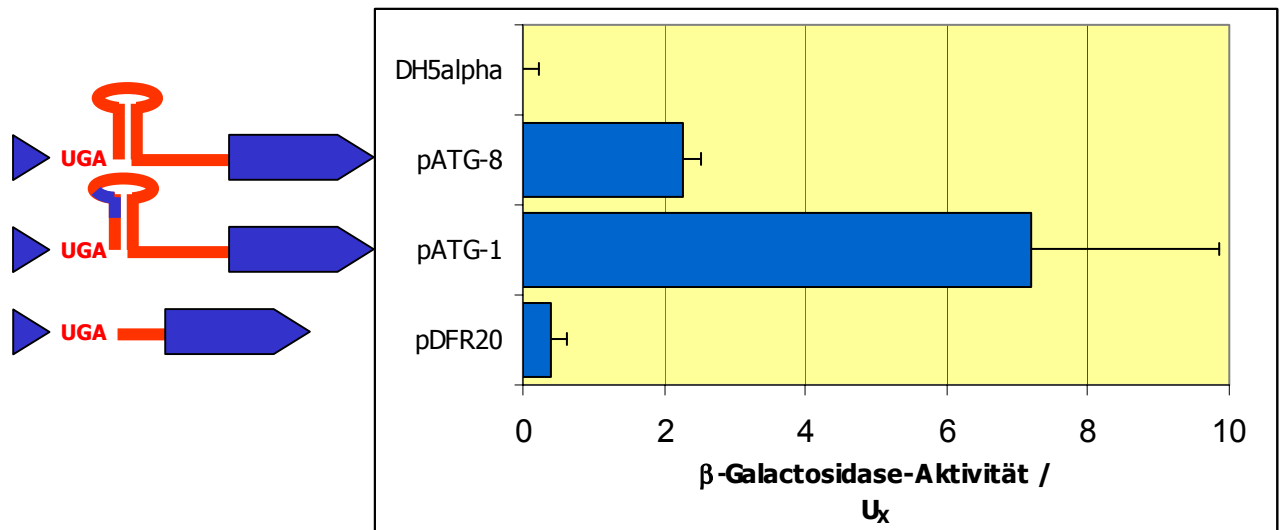


Abb.70: Graphische Darstellung verschiedener Reporter-Genkonstrukte und der β -Galactosidase Aktivität (inkl. Standardabweichung), die aus ihnen in DH5 α resultiert (siehe 3.9.3.).

Die Pfeilspitze symbolisiert den Promotor und das Startcodon von *lacZ*, der Pfeil symbolisiert das Reporter-Gen *lacZ α* . In blau sind DNA-Bereiche aus *E. coli* dargestellt und solche, die durch *genetic engineering* verändert worden sind; in rot sind die DNA-Bereiche aus *B. japonicum* 110*spc4* dargestellt.

Die Übereinstimmungen in der potentiellen mRNA Region downstream des UGA, sowie die Bindeenergien resultierender stem-loop Strukturen, lassen zusammengefaßt mit den Ergebnissen der translationalen Reporter-Genfusionen den Schluß zu, daß es in *E. coli* zu einer cotranslationalen Insertion von Selenocystein in Ub12 kommt.

Damit wird die Vermutung unterstützt, daß es sich bei dem symbioserelevanten ORF *ub12* von *B. japonicum* 110*spc4* um das Gen eines Selenoproteins handelt.

4.5. Ausblick

Es bleibt zu beachten, daß sich die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf das Zusammenspiel von *B. japonicum* 110*spc4* und *Glycine max* beschränken, wohingegen die Sojabohne unter natürlichen Bedingungen gleichzeitig auch mit arbuskulären Mycorrhiza Pilzen in symbiotischem Kontakt steht, in dieser Symbiose stehen also mindestens drei Partner in direktem Kontakt und in gegenseitiger Abhängigkeit (Ross *et al.*, 1970; De Varennes *et al.*, 2000), wobei die Endosymbionten nicht nur mit dem pflanzlichen Partner interagieren, sondern auch untereinander (Requena *et al.*, 1999). Wenn man in der Zukunft Aussagen treffen will, die die tatsächlichen Vorgänge unter Freilandbedingungen beschreiben, muß dieser Aspekt in den Versuchsanordnungen und Analysen Beachtung finden.

4.5.1. Die Mutante *B. japonicum* 2-10

Komplementationsversuche mit größeren DNA-Fragmenten, Reportergenfusionen in *B. japonicum* 110*spc4* sowie das Einbringen von Teilen der untersuchten DNA-Region auf einem zusätzlichen Plasmid können evtl. für eine Aufklärung der Organisation und der relevanten Faktoren auf DNA-Ebene sorgen.

Um die Verhältnisse in *B. japonicum* 2-10 vollständig aufzuklären, müssen darüberhinaus die Expressionsbedingungen aufgeklärt werden, unter denen der ORF *ub12* exprimiert wird. Dazu könnte ein microarray zum Einsatz kommen, das Resultat kann dann auch zur Analyse eines möglichen Selen-Einbaus verwendet werden.

Um die Expression von Ub12 nachzuweisen, muß es aus *B. japonicum* isoliert und möglichst sequenziert werden. Unter Anpassung der Expressionsbedingungen in *E. coli* (inkl. Verwendung eines anderen Systems) kann evtl. ausreichend Protein isoliert werden, um vorab Aussagen treffen zu können, und Antikörper zu konstruieren. Ansonsten ist ein möglicher Weg die Konstruktion synthetischer Antikörper, basierend auf den Epitopen, die anhand der von *ub12* abgeleiteten AS-Sequenz vorausgesagt werden. Solche Antikörper können dann zur Isolation des Proteins eingesetzt werden, aber parallel auch zur Lokalisierung von Ub12 in der Zelle dienen, um die postulierte Position in der Cytoplasmamembran zu verifizieren.

4.5.2. Funktion und Wirkung von Selen in *B. japonicum* 110*spc4*

Im Genom der bereits vollständig sequenzierten Rhizobien-Stämme von *Mesorhizobium loti* und *Sinorhizobium meliloti* sind essentielle Teile des Selenocystein-Biosynthese- und des Selenocystein-Insertions-Apparates lokalisiert worden.

Da die Sequenz eines *B. japonicum* Stammes in naher Zukunft publiziert wird, kann eine Identifizierung von *sel*-homologen Genen in *B. japonicum* 110*spc4* mittels Amplifizierung, Sequenzierung und Protein-Analyse erfolgen. Außerdem kann anhand dieser Sequenz vermutlich die gesamte Sequenz von *sbp* aus *B. japonicum* 110*spc4* identifiziert und in den Kontext der vorangegangenen Versuche eingeordnet werden.

Die Beobachtung, daß in *B. japonicum* 110*spc4* ein unspezifischer Einbau von Selen in das Proteom erfolgt, schließt keineswegs aus, daß es einen Weg des spezifischen Einbaus gibt. Auch in *E. coli* findet ein unspezifischer Einbau von Selen statt, solange er nicht durch Zugabe von Cystein unterdrückt wird (Müller *et al.*, 1997). Es ist demnach möglich,

daß es auch für *B. japonicum* 110*spc4* äußere Bedingungen gibt, unter denen nur spezifischer Einbau von Selen in Selenoproteine erfolgt. Leider ist es uns noch nicht gelungen, diese Bedingungen zu identifizieren.

Um die unspezifische Inkorporation von Selen in Proteine von *B. japonicum* 110*spc4* mittels *genetic engineering* vollständig zu unterdrücken, müßte der Weg der Inkorporation von Schwefel in die Proteine unterbrochen werden. Eine adäquate Strategie wäre es, das zentrale Gen *cysE* durch eine *knock out* Mutation zu unterbrechen – beziehentlich auf die Vorgänge in *E. coli*. Eine solche Mutante sollte Cystein auxotroph sein und es bei Zugabe von Cystein und [⁷⁵Se]-Selenit ermöglichen, den spezifischen Einbau von Selen in *B. japonicum* 110*spc4* zu dokumentieren.

Für die Versuche zur Identifizierung Selenocystein-codierender Sequenzen aus *B. japonicum* 110*spc4* in *E. coli* gibt es verschiedene Ansatzmöglichkeiten.

Wenn die Sequenz von SelB aus *B. japonicum* 110*spc4* identifiziert wird, könnte eine Coexpression mit den RGF-Hybridplasmiden einen verstärkten Einbau von Selenocystein in *E. coli* bewirken. Das Screenen von *E. coli* SelB Mutanten wäre sozusagen der gleiche Weg aus der anderen Richtung. Man würde nach einem *E. coli* Klon suchen, dessen SelB so verändert ist, daß es die stem-loop Struktur aus *B. japonicum* 110*spc4* besser binden kann und damit an dieser Stelle verstärkt eine cotranslationale Insertion von Selenocystein bewirkt (in Anlehnung an Kromayer *et al.*, 1999).

Ein völlig anderer Ansatz wäre es, die Markierungsversuche mit [⁷⁵Se]-Selenit in *E. coli* in einer CysE Mutante zu wiederholen, in der kein Einbau von Selen über den Weg des Schwefels mehr erfolgt. Damit wäre es möglich, die Versuchsbedingungen - vorrangig bezüglich der Inkubationszeit - denen des *in vivo* β -Galactosidase Tests anzupassen.

Die beschriebenen RGF-Konstrukte können in diesen Ansätzen direkt eingesetzt werden und damit parallel die Expressionshöhe als Referenz zur Selen-Inkorporation dokumentieren. Das System der radioaktiven Markierung mit [⁷⁵Se]-Selenit ist auf jeden Fall sensibel genug, um unter diesen Umständen den Einbau von Selenocystein in Ub12 in *E. coli* nachzuweisen.

5. Zusammenfassung

Die Mutante *B. japonicum* 2-10 ist durch die singuläre Insertion des Transposons *TnphoA* in mehreren Entwicklungsstadien gegenüber dem WT *B. japonicum* 110*spc4* verändert.

Unter freilebenden Bedingungen weist *B. japonicum* 2-10, im Vergleich zum WT, ein verringertes Zellvolumen auf. Die Exopolysaccharide der Mutante haben einen leicht erhöhten Anteil HMW-EPS und es zeigen sich darüberhinaus Unterschiede in den unlöslichen Exkretionsprodukten. Unter mikroaeroben Bedingungen wird mindestens ein Genprodukt von ca. 27 kDa in *B. japonicum* 2-10 nicht synthetisiert. *B. japonicum* 2-10 ist in einigen Stoffwechselvorgängen verlangsamt, wie z.B. in der Anpassungsfähigkeit an veränderte C-Quellen. Diese Faktoren deuten unter anderem auf eine beschleunigte Alterung der Zellen hin.

In der Ausbildung der Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow zeigen sich Störungen in zwei Phasen. Zuerst induziert *B. japonicum* 2-10 nur eine stark verminderte Anzahl von Wurzelknöllchen an der Pflanze und im späteren Verlauf der Interaktion zeigt sich, daß *B. japonicum* 2-10 nicht zu einer effektiven Besiedlung der Zellen des inneren Knöllchengewebes befähigt ist. Obwohl die Mutante unter mikroaeroben Bedingungen wachsen kann und unter den gegebenen Umständen eine aktive Nitrogenase exprimiert, werden die Bakterien von der Pflanze nicht als Mikrosymbiont akzeptiert sondern lysiert.

Ein 6678 bp großes Fragment aus *B. japonicum* 110*spc4*, das den Bereich der *TnphoA*-Insertion in *B. japonicum* 2-10 umfaßt, ist sequenziert worden.

Der Insertions-Ort des Transposons *TnphoA* im Genom von *B. japonicum* 2-10 ist der ORF *ub12*, dessen Symbioserelevanz durch VIM bestätigt worden ist.

Der ORF *ub12* enthält ein *in frame* TGA Codon, das abhängig von der Länge und der Sequenz der downstream anschließenden Sequenz in *E. coli* überlesen wird.

Die Ergebnisse der Reportergernefusionen in *E. coli* und *B. japonicum* 110*spc4*, gepaart mit den Daten der Mutagenesen und der *in silico* Analyse, leiten zu der Hypothese, daß es sich bei dem abgeleiteten Genprodukt Ub12 um ein Selenoprotein handelt. Die cotranslationale Inkorporation von Selenocystein erfolgt in diesem Fall an einem UGA Codon in der mRNA, unter Mitwirkung einer direkt downstream lokalisierten potentiellen stem-loop Struktur. Ub12 wäre damit das erste symbioserelevante Selenoprotein und das erste in Rhizobien gefundene Selenoprotein.

Es sind noch weitere ORFs sequenziert und analysiert worden, über die keinerlei Daten bezüglich ihrer Funktion vorliegen, von denen aber zumindestens der ORF *ub4* für die Ausbildung einer effektiven Symbiose mit *Glycine max* bv. Maple Arrow essentiell ist.

Die Daten der Komplementationsversuche und der gerichteten Mutagenesen geben Grund zu der Vermutung, daß die DNA-Region um die *TnphoA*-Insertion in *B. japonicum* 2-10 auch regulatorische Besonderheiten aufweist. Außer den ORFs selbst scheint auch ihre Kopienzahl und die Anordnung von entscheidender Bedeutung für den Einfluss auf die Symbiose mit *Glycine max* bv. MAPLE ARROW zu sein.

Mittels Southern Blotting ist ein Bereich im Genom von *B. japonicum* 110*spc4* aufgedeckt worden, der Ähnlichkeit mit dem Gen der Selenocystein-Synthase (*selA*) aus *E. coli* hat. Eine weitere Lokalisierung der Gene des Selenocystein-Biosyntheseapparates in *B. japonicum* 110*spc4* sollte anhand der in Kürze zur Verfügung stehenden Sequenzdaten erfolgen können.

Von dem ORF *sbp* in *B. japonicum* 110*spc4* ist bisher nur der Teil sequenziert worden, der den N-Terminus des potentiellen Selen bindenden Proteins codiert. Sbp ist bereits in dem Makrosymbionten, *Glycine max*, identifiziert worden. Sein Vorkommen in *B. japonicum* 110*spc4* kann auf eine Konkurrenz bezüglich des Spurenelementes Selen in der symbiotischen Interaktion hindeuten. Durch die gerichtete Mutagenese von *sbp* und die Analyse der Mutanten in der Interaktion mit *Glycine max* bv. Maple Arrow ist belegt worden, daß dieser DNA-Bereich bei der Besiedlung der Pflanzenzellen und der Fixierung von Luftstickstoff in der Symbiose eine Rolle spielt.

Der ORF *intA*, der innerhalb dieser Arbeit in *B. japonicum* 110*spc4* identifiziert, an verschiedenen Stellen mutiert und eingehend untersucht worden ist, codiert allen erzielten Ergebnissen zufolge eine Integrase aus der Familie der Phagen-Integrasen. Eine Funktion des abgeleiteten Genproduktes IntA in der Evolution der Rhizobien und in der Vergrößerung des Wirtsspektrums, wie sie für diese Enzymklasse beschrieben wird, kann im Nachhinein nur vermutet werden.

Es kann dagegen klar bewiesen werden, daß *intA* von *B. japonicum* 110*spc4* für die Infizierung der Wurzelknöllchen und die symbiontische Stickstoff-Fixierung in der Interaktion mit *Glycine max* bv. Maple Arrow von entscheidender Bedeutung ist.

6. Literaturverzeichnis

Allen, N. S., Bennet, M. N., Cox, D. N., Shipley, A., Ehrhardt, D. W., Long, S. R. (1994): Effects of Nod factors on alfalfa root hair Ca^{2+} and H^{+} currents and on cytoskeleton behaviour. *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Osbourne, A. E. **3**: 107-114.

Altmann (1890): *Die Elementarorganismen und ihre Beziehung zu den Zellen*. Leipzig, Veit und Comp.

Ausubel, F. M., Brendt, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., Eds. (1992): *Short protocols in molecular biology*, second edition. New York (USA), Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons.

Barell, G., Bankier, A. T., Drouin, J. (1979): A different genetic code in human mitochondria. *Nature*. **282**: 189-194.

Barny, M. A., Schoonejans, E., Economou, A., Johnston, A. W., Downie, J. A. (1996): The C-terminal domain of the *Rhizobium leguminosarum* chitin synthase NodC is important for function and determines the orientation of the N-terminal region in the inner membrane. *Mol. Microbiol.* **19**(3): 443-453.

Baron, C., Heider, J., Böck, A. (1993): Interaction of translation factor SelB with the formate dehydrogenase H selenopeptide mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**: 4181-4185.

Baron, C., Zambryski, P. C. (1995): The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Annu. Rev. Genet.* **29**: 107-129.

Batut, J., Boistard, P. (1994): Oxygen control in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **66**(1-3): 129-150.

Bazin, M. J., Markham, P., Scott, E. M., Lynch, J. M. (1990): Population dynamics and rhizosphere interaction. *Lynch, J. M.*: 99-127.

Becker, B. U., Kosch, K., Parniske, M., Müller, P. (1998): Exopolysaccharide (EPS) synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: sequence, operon structure and mutational analysis of an *exo* gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* **259**(2): 161-171.

Berg, B. L., Baron, C., Stewart, V. (1991): Nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **266**(33): 22386-22391.

Bergersen, F. J., Turner, G. L. (1975): Leghaemoglobin and the supply of O_2 to nitrogen-fixing root nodule bacteroids: presence of two oxidase systems and ATP production at low free O_2 concentration. *J. Gen. Microbiol.* **91**(2): 345-354.

Bessho, Y., Ohama, T., Osawa, S. (1992): Planarian mitochondria. II. The unique genetic code as deduced from cytochrome c oxidase subunit I gene sequences. *J. Mol. Evol.* **34**(4): 331-335.

- Bhuvaneswari, T. V., Pueppke, S. G., Bauer, W. D.** (1977): Role of lectins in plant-microorganism interactions. *Plant Physiol.* **60**: 486-491.
- Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, B., Zinoni, F.** (1991): Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol. Microbiol.* **5**: 515-520.
- Bölker, M.** (2001): *Ustilago maydis* - a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology.* **147**: 1395-1401.
- Boursier, P., Hanus, F. J., Becker, M. M., Russel, S. A., Evans, H. J.** (1988): Selenium increases hydrogenase expression in autotrophically cultured *Bradyrhizobium japonicum* and is a constituent of the purified enzyme. *J. Bacteriol.* **170**(12): 5594-5600.
- Brewin, N. J.** (1991): Development of the legume root nodule. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **7**: 191-226.
- Brisson, N., Pombo-Gentile, A., Verma, D. P. S.** (1982): Organization and expression of leghaemoglobin genes. *Can. J. Biochem.* **60**(3): 272-278.
- Callaham, D. A., Torrey, J. G.** (1981): The structural basis of infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* **59**: 1647-1664.
- Carlson, R. W., Price, N. P. J., Stacey, G.** (1995): The biosynthesis of rhizobial lipooligosaccharide nodulation signal molecules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **7**: 684-695.
- Chaddock, A. M., Mant, A., Karnauchov, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klosgen, R. B., Robinson, C.** (1995): A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *EMBO J.* **14**(12): 2715-2722.
- Chauhan, S., O'Brian, M. R.** (1997): Transcriptional regulation of δ -Aminolevulinic acid dehydratase synthesis by oxygen in *Bradyrhizobium japonicum* and evidence for developmental control of the *hemB* gene. *J. Bacteriol.* **179**(11): 3706-3710.
- Chocat, P., Esaki, N., Nakamura, T., Tanaka, H., Soda, K.** (1983): Microbial distribution of selenocysteine lyase. *J. Bacteriol.* **156**(1): 455-457.
- Cowie, D. B., Cohen, G. B.** (1957): Biosynthesis by *Escherichia coli* of active altered proteins containing selenium instead of sulfur. *Biochim. Biophys. Acta.* **26**: 252-261.
- Craven, G., Steers, E., Anfinsen, C.** (1965): Purification, composition and molecular weight of the β -galactosidase of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* **240**: 2468-2477.
- Crespi, M., Jurkevitch, E., Poiter, M., D'Aubenton-Carafa, Y., Petrovics, G., Kondorosi, E., Kondorosi, A.** (1994): Enod40, a gene expressed during nodule organogenesis codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J.* **13**: 5099-5112.

- Crockard, M. A., Bjourson, A. J., Cooper, J. E.** (1999): A new peroxidase cDNA from white clover: its characterization and expression in root tissue challenged with homologous rhizobia, heterologous rhizobia, or *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**(9): 825-828.
- D´Haeze, W., Holsters, M.** (2002): Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology.* **12**(6): 79R-105R.
- Dalal, F. R., Gots, R. E., Gots, J. S.** (1966): Mechanism of adenine inhibition in adenine-sensitive mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **91**(2): 507-513.
- Dazzo, F. B., Yanke, W. E., Brill, W. J.** (1978): Trifoliin: a *Rhizobium* recognition protein from white clover. *Biochim. Biophys. Acta.* **539**: 276-286.
- De Varennes, A., Antunes, P., Goss, M. J.** (2000): Effects of soil disturbance on the efficacy of indigenous mycorrhizal fungi in enhancing nitrogen fixation by soybeans. Annual Meeting of ASA, CSSA, SSSA, Minneapolis (USA).
- Dekkers, L. C., Claartje, C. P., Van Der Fits, L., Lugtenberg, B. J. J.** (1998): A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 7051-7056.
- Dekkers, L. C., Mulders, I. H., Phoelich, C. C., Chin-A-Wong, T. F., Wijffjes, A. H., Lugtenberg, B. J. J.** (2000): The *sss* colonization gene of the tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild-type *Pseudomonas* ssp. bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**(11): 1177-1183.
- DeLisa, M. P., Samuelson, P., Palmer, T., Georgiou, G.** (2002): Genetic analysis of the twin arginine translocator secretion pathway in bacteria. *J. Biol. Chem.* **277**(33): 29825-29831.
- Denarie, J., Cullimore, J.** (1993): Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell.* **74**: 951-954.
- Diaz, C. L., Logman, T. J. J., Stam, H., Kijne, W. J.** (1995): Sugar-binding activity of pea lectin expressed in white clover hairy roots. *Plant Physiol.* **109**: 1167-1177.
- Djordjevic, S. P., Chen, H., Batley, M., Redmond, J. W., Rolfe, B. G.** (1987): Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. *J. Bacteriol.* **169**(1): 53-60.
- Downie, J. A., Knight, C. D., Johnston, A. W. B., Rossen, L.** (1985): Identification of genes and gene products involved in the nodulation of peas by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Gen. Genet.* **198**: 255-262.
- Dubnau, D., Davidoff-Abelson, R.** (1971): Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **56**: 209-221.

- Eggleston, G., Huber, M. C., Liang, R.-T., Karr, A. L., Emerich, D. W.** (1996): *Bradyrhizobium japonicum* mutants deficient in exo- and capsular polysaccharides cause delayed infection and nodule initiation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**(5): 419-423.
- Ehrhardt, D. W., Atkinson, E. M., Long, S. R.** (1992): Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science.* **256**: 998-1000.
- Emelyanov, V. V.** (2001): Evolutionary relationship of Rickettsiae and mitochondria. *FEBS Lett.* **501**(1): 11-18.
- Engelberg-Kulka, H.** (1981): UGA suppression by normal tRNA^{Trp} in *Escherichia coli*: codon context effects. *Nucleic Acids Res.* **9**(4): 983-991.
- Esaki, N., Karai, N., Nakamura, T., Tanaka, H., Soda, K.** (1985): Mechanism of reactions catalyzed by selenocysteine beta-lyase. *Arch. Biochem. Biophys.* **238**(2): 418-423.
- Esaki, N., Nakamura, T., Tanaka, H., Soda, K.** (1982): Selenocysteine lyase, a novel enzyme that specifically acts on selenocysteine. Mammalian distribution and purification and properties of pig liver enzyme. *J. Biol. Chem.* **257**(8): 4386-4391.
- Evans, H. J., Purohit, K., Cantrell, M. A., Eisbrenner, G., Russel, S. A., Hanus, F. J., Lepo, J. E.** (1981): Hydrogen losses and hydrogenases in nitrogen-fixing organisms. Current perspectives in nitrogen fixation. Newton, W. E. Canberra (Aus), The Australian Academy of Science.
- Ey, P. L., Ashman, L. K.** (1986): The use of alkaline phosphatase-conjugated anti-immunoglobulin with immunoblots for determining the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures. *Methods Enzymol.* **121**: 497-509.
- Fernandez-Lopez, M., Goormachtig, S., Gao, M., D' Haeze, W., Van Montagu, M., Holsters, M.** (1998): Ethylene-mediated phenotypic plasticity in root nodule development on *Sesbania rostrata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**(21): 12724-12728.
- Fischer, H. M.** (1996): Environmental regulation of rhizobial symbiotic nitrogen fixation genes. *Trends Microbiol.* **4**(8): 317-320.
- Fischer, H. M., Velasco, L., Delgado, M. J., Bedmar, E. J., Scharen, S., Zingg, D., Göttfert, M., Hennecke, H.** (2001): One of two *hemN* genes in *Bradyrhizobium japonicum* is functional during anaerobic growth and in symbiosis. *J. Bacteriol.* **183**(4): 1300-1311.
- Fisher, R. F., Long, S. R.** (1992): *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature.* **357**: 655-660.
- Flemetakis, E., Agalou, A., Kavroulakis, N., Dimou, M., Martsikovskaya, A., Slater, A., Spaink, H. P., Roussis, A., Katinakis, P.** (2002): *Lotus japonicus* gene *Ljsbp* is highly conserved among plants and animals and encodes a homologue to the mammalian selenium-binding proteins. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**(4): 13-22.

- Flemetakis, E., Kavroulakis, N., Quadvlieg, N. E. M., Spaink, H. P., Dimou, M., Roussis, A., Katinakis, P.** (2000): *Lotus japonicus* contains two distinct ENOD40 genes that are expressed in symbiotic, nonsymbiotic, and embryonic tissues. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**(9): 987-994.
- Forchhammer, K., Böck, A.** (1991): Biologie und Biochemie des Elements Selen. *Naturwissenschaften.* **78**: 497-504.
- Glazebrook, J., Ichige, A., Walker, G. C.** (1993): A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* peptide-antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. *Genes Dev.* **7**: 1485-1497.
- Gober, J. W., Kashket, E. R.** (1985): Methylammonium uptake by *Rhizobium* sp. strain 32H1. *J. Bacteriol.* **153**: 1196-1201.
- Goethals, K., Van Montagu, M., Holsters, M.** (1992): Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveals a common structure in promoters regulated by LysR type proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 1646-1650.
- Gouy, M., Gautier, C.** (1982): Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Res.* **10**(22): 7055-7074.
- Gross, R., Simon, J., Kroger, A.** (1999): The role of the twin-arginine motif in the signal peptide encoded by the *hydA* gene of the hydrogenase from *Wolinella succinogenes*. *Arch. Microbiol.* **172**(4): 227-232.
- Gursinsky, T., Jäger, J., Andreesen, J. R., Söhling, B.** (2000): A *selDABC* cluster for selenocysteine incorporation in *Eubacterium acidaminophilum*. *Arch. Microbiol.* **174**: 200-212.
- Györgypal, Z., Iyer, N., Kondorosi, A.** (1988): Three regulatory *nodD* alleles of divergent flavonoid-specificity are involved in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 85-92.
- Hanahan, D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Heider, J., Baron, C., Böck, A.** (1992): Coding from a distance: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into protein. *EMBO J.* **11**(10): 3759-3766.
- Heider, J., Böck, A.** (1993): Selenium metabolism in micro-organisms. *Adv. Microbial Physiol.* **35**: 71-109.
- Heider, J., Forchhammer, K., Sawers, G., Böck, A.** (1991): Interspecies compatibility of selenoprotein biosynthesis in Enterobacteriaceae. *Arch. Microbiol.* **155**: 221-228.
- Heidstra, R., Geurts, R., Franssen, H., Spaink, H., Van Kammen, A., Bisseling, T.** (1994): Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* **105**: 787-797.

Hellriegel, H., Willfarth, H. (1888): Untersuchungen über die Stickstoffaufnahme der Gramineen und Leguminosen. Beilageheft zu der Zeitschr. d. Vereins für die Rübenzuckerindustrie des Deutsch. Reiches. **Nov. 1888.**

Höfte, M., Dong, Q., Kourambas, S., Krishnapillai, V., Sherratt, D., Mergeay, M. (1994): The *sss* gene product, which affects pyoverdinin production in *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2, is a site-specific recombinase. *Mol. Microbiol.* **14**(5): 1011-1020.

Hohl, W., Stahl, B., Mundkowski, R., Hofmann, U., Meese, C. O., Kuhlmann, U., Schlegel, W. (1993): Mass determination of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase from human placenta and kinetic studies with (5Z, 8E, 10E, 12S)-12-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid as substrate. *Eur. J. Biochem.* **214**(1): 67-73.

Hombrecher, G., Gotz, R., Dibb, N. J., Downie, J. A., Johnston, A. W. B., Brewin, N. J. (1984): Cloning and mutagenesis of nodulation genes from *Rhizobium leguminosarum* TOM, a strain with extended host range. *Mol. Gen. Genet.* **194**: 293-298.

Horvath, B., Heidstra, R., Lados, M., Moerman, M., Spaink, H. P., Prome, J.-C., Van Kammen, A., Bisseling, T. (1993): Lipo-oligosaccharides of *Rhizobium* induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs. *Plant J.* **4**: 727-733.

Horwitz, J. P., Chua, J., Noel, M., Donatti, J. T., Freisler, J. (1966): Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. II. Some dihalo-3-indolyl phosphates and sulfates. *J. Med. Chem.* **9**(3): 447.

Hutcheson, S. H. (1998): Current concepts of active defense in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 59-90.

Hüttenhofer, A., Böck, A. (1998): RNA structures involved in selenoprotein synthesis. RNA structure and function, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hüttenhofer, A., Westhof, E., Böck, A. (1996): Solution structure of mRNA hairpins promoting selenocysteine incorporation in *Escherichia coli* and their base-specific interaction with special elongation factor SELB. *RNA.* **2**: 354-366.

Ichige, A., Walker, G. C. W. (1997): Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti bacA* gene: functional interchangeability with the *Escherichia coli sbmA* gene and phenotypes of mutants. *J. Bacteriol.* **179**: 209-216.

Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H., Brow, M. A. (1988): DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**(24): 9436-9440.

Ishida, K., Morino, T., Takagi, K., Sukenaga, Y. (1987): Nucleotide sequence of a human gene for glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res.* **15**(23): 10051.

Ishida, T., Ishii, Y., Yamada, H., Oguri, K. (2002): The induction of hepatic selenium-binding protein by Aryl hydrocarbon (Ah)-receptor ligands in rats. *J. Health Sci.* **48**(1): 62-68.

- Jordan, D. C.** (1982): Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**: 136-139.
- Journet, E. P., Pichon, M., Dedieu, A., De Billy, F., Truchet, G., Barker, D. G.** (1994): *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *Plant J.* **6**: 241-249.
- Joyce, P. Y., Stacey, G.** (1996): Inhibition of nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum* by organic acids. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**(5): 424-428.
- Jukes, T. H., Osawa, S.** (1993): Evolutionary changes in the genetic code. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **106**(3): 489-494.
- Kadreva, I., Ignatov, G.** (1995): Role of Ca^{2+} in *Bradyrhizobium japonicum* strain 273 attachment ability and accumulation on soybean root surface. *J. Plant Physiol.* **145**: 577-579.
- Karlin, S., Altschul, S. F.** (1990): Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 2264-2268.
- Karlin, S., Altschul, S. F.** (1993): Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 5873-5877.
- Karr, D. B., Liang, R. T., Reuhs, B. L., Emerich, D. W.** (2000): Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation. *Planta.* **211**(2): 218-226.
- Kato, G., Maruyama, Y., Nakamura, M.** (1980): Role of bacterial polysaccharides in the adsorption of the *Rhizobium*-pea symbiosis. *Agric. Biol. Chem.* **44**(12): 2843-2855.
- Knecht, D. A., Dimond, R. L.** (1984): Visualization of antigenic proteins on Western blots. *Anal. Biochem.* **136**(1): 180-184.
- Koch, B., Evans, H. J.** (1966): Reduction of acetylen to ethylen by soybean root nodules. *Plant Physiol.* **41**: 1748-1750.
- Kolb, F. A., Westhof, E., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Gerhart, E., Wagner, H., Romby, P.** (2001): Bulged residues promote the progression of a loop-loop interaction to a stable and inhibitory antisense-target RNA complex. *Nucleic Acids Res.* **29**(15): 3145-3153.
- Koltai, H., Dhandaydham, M., Opperman, C., Thomas, J., Bird, D.** (2001): Overlapping plant signal transduction pathways induced by a parasitic nematode and a rhizobial endosymbiont. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**(10): 1168-1177.
- Kosslak, R. M., Bookland, R., Barkei, J., Paaren, H. E., Appelbaum, E. R.** (1987): Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 7428-7432.

- Kouchi, H., Hata, S.** (1993): Isolation and characterization of novel nodulins cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol. Gen. Genet.* **238**: 106-119.
- Kundig, C., Hennecke, H., Göttfert, M.** (1993): Correlated physical and genetic map of the *Bradyrhizobium japonicum* genome. *J. Bacteriol.* **175**(3): 613-622.
- Laguerre, G., Mazurier, S. I., Amarger, N.** (1992): Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* **101**: 17-26.
- Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., Amarger, N.** (2001): Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology.* **147**: 981-993.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J.-C., Denarie, J.** (1990): Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acetylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature.* **344**: 781-784.
- Li, C., Reches, M., Engelberg-Kuka, H.** (2000): The bulged nucleotide in the *Escherichia coli* minimal selenocysteine insertion sequence participates in the interaction with SelB: a genetic approach. *J. Bacteriol.* **182**(22): 6302-6307.
- Liu, Z., Reches, M., Groisman, I., Engelberg-Kuka, H.** (1998): The nature of the minimal 'selenocysteine insertion sequence' (SECIS) in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **26**(4): 896-902.
- Liu, Z., Reches, M., Groisman, I., Engelberg-Kulka, H.** (1998): The nature of the minimal 'selenocysteine insertion sequence' (SECIS) in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **26**(4): 896-902.
- Loh, J., Lohar, D. P., Andersen, B., Stacey, G.** (2002): A two-component regulator mediates population-density-dependent expression of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *J. Bacteriol.* **184**(6): 1759-1766.
- Loh, J. T., Stacey, G.** (2001): Feedback regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *Mol. Microbiol.* **41**(6): 1357-1364.
- Long, S. R.** (1989): *Rhizobium*-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell.* **56**: 203-214.
- Lopez-Garcia, S. L., Vazquez, T. E., Favelukes, G., Lodeiro, A. R.** (2001): Improved soybean root association of N-starved *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **183**(24): 7241-7252.
- Lopez-Garcia, S. L., Vazquez, T. E., Favelukes, G., Lodeiro, A. R.** (2002): Rhizobial position as a main determinant in the problem of competition for nodulation in soybean. *Environ. Microbiol.* **4**(4): 216-224.

- Louch, H. A., Miller, K. J.** (2001): Synthesis of a low-molecular-weight form of exopolysaccharide by *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(2): 1011-1014.
- Low, S. C., Berry, M. J.** (1996): Knowing when not to stop: selenocysteine insertion in eukaryotes. *TIBS.* **21**: 203-208.
- Lugtenberg, B. J. J., Dekkers, L. C.** (1999): What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environ. Microbiol.* **1**(1): 9-13.
- Lugtenberg, B. J. J., Dekkers, L. C., Bloemberg, G. V.** (2001): Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**: 461-490.
- Maier, U. G., Hofmann, C. J., Eschbach, S., Wolters, J., Igloi, G. L.** (1991): Demonstration of nucleomorph-encoded eukaryotic small subunit ribosomal RNA in cryptomonads. *Mol. Gen. Genet.* **230**(1-2): 155-160.
- Mandel, M., Higa, A.** (1970): Calcium-dependent bacteriophage infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162.
- Maniatis, T., Frisch, E. F., Sambrook, J.** (1982): Molecular cloning, a laboratory manual. New York (USA), Cold Spring Harbour Laboratory.
- Manoil, C., Beckwith, J.** (1985): *Tn_{phoA}*: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**(23): 8129-8133.
- Manoil, C., Beckwith, J.** (1986): A genetic approach to analyzing membrane protein topology. *Science.* **233**(4771): 1403-1408.
- Marcker, A., Lund, M., Jensen, E. O., Marcker, K. A.** (1984): Transcription of the soybean leghaemoglobin genes during nodule development. *EMBO Journal.* **3**(8): 1691-1695.
- Margulis, L.** (1981): Symbiosis in cell evolution, life and its environment on early earth, W. H. Freeman and Company, USA.
- Martinez, E., Pardo, M. A., Palacios, R., Cevallos, M. A.** (1985): Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1779-1786.
- McFadden, G. I., Gilson, P. R., Hofmann, C. J. B., Adcock, G. J., Maier, U. G.** (1994): Evidence that an amoeba acquired a chloroplast by retaining part of an engulfed eukaryotic alga. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 3690-3694.
- Meloni, S., Rey, L., Sidler, S., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., Palacios, J.** (2002): A *Rhizobium leguminosarum* TAT (twin-arginine translocation) mutant shows pleiotropic defects affecting both free-living and symbiotic life styles. 5th European Nitrogen Fixation Conference, Norwich, England.

- Mergaert, P., Van Montagu, M., Holsters, M.** (1997): Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol. Microbiol.* **25**(5): 811-817.
- Michaelis, S., Inouye, H., Oliver, D., Beckwith, J.** (1983): Mutations that alter the signal sequence of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **154**(1): 366-374.
- Miller, J. H.** (1972): Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miller, J. H., Albertini, A. M.** (1983): Effects of surrounding sequence on the suppression of nonsense codons. *J. Mol. Biol.* **164**: 59-71.
- Mithofer, A., Bhagwat, A. A., Keister, D. L., Ebel, J.** (2001): *Bradyrhizobium japonicum* mutants defective in cyclic beta-glucan synthesis show enhanced sensitivity to plant defense responses. *Z. Naturforsch.* **56**(7-8): 581-584.
- Morrison, D. A.** (1977): Transformation in *Escherichia coli*: Cryogenic preservation of competent cells. *J. Bacteriol.* **132**(1): 349-351.
- Mort, A. J., Bauer, W. D.** (1980): Composition of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum*. *Plant Physiol.* **66**: 158-163.
- Müller, P., Ahrens, K., Keller, T., Klaucke, A.** (1995): A *TnphoA* insertion within the *Bradyrhizobium japonicum* *sipS* gene, homologous to prokaryotic signal peptidases, results in extensive changes in the expression of PBM-specific nodulins of infected soybean (*Glycine max*) cells. *Mol. Microbiol.* **18**: 831-840.
- Müller, P., Hynes, M. F., Kapp, D., Niehaus, K., Pühler, A.** (1988): Two classes of *Rhizobium meliloti* infection mutants differ in exopolysaccharide production and coinoculation properties with nodulation mutants. *Mol. Gen. Genet.* **211**: 17-26.
- Müller, S., Heider, J., Böck, A.** (1997): The path of unspecific incorporation of selenium in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **168**: 421-427.
- Mulligan, J. T., Long, S. R.** (1985): Induction of *Rhizobium meliloti* *nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 6609-6613.
- Nap, J.-P., Bisseling, T.** (1990): Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science.* **250**: 948-954.
- Nash, H. A.** (1996): Site-specific recombination: integration, excision, resolution and inversion of defined DNA segments. *Escherichia coli* and *Salmonella*: *Cellular and Molecular Biology*. Umbarger, H. E. Washington (USA), American Society of Microbiology Press. **2**: 2363-2376.
- Nienaber, A., Huber, A., Göttfert, M., Hennecke, H., Fischer, H. M.** (2000): Three new NifA-regulated genes in the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic gene region discovered by competitive DNA-RNA hybridization. *J. Bacteriol.* **182**(6): 1472-1480.

- Nunes-Düby, S. E., Kwon, H. J., Tirumalai, R. S., Ellenberger, T.** (1998): Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* **26**(2): 391-406.
- Ohman, M., Wagner, E. G.** (1991): Regulation of replication of plasmid R1: an analysis of the intergenic region between *copA* and *repA*. *Mol. Gen. Genet.* **230**(1-2): 321-328.
- Oke, V., Long, S. R.** (1999): Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* **32**(4): 837-849.
- Osawa, S., Jukes, T. H., Watanabe, K., Muto, A.** (1992): Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol. Rev.* **56**(1): 229-264.
- Papen, H., Werner, D.** (1980): Biphasic nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* in long lasting batch cultures. *Arch. Microbiol.* **128**: 209-214.
- Pardee, A. B., Jacob, F., Monod, J.** (1959): The genetic control and cytoplasmic expression of "inducibility" in the synthesis of β -Galactosidase by *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **1**: 165-178.
- Parniske, M.** (2000): Intracellular accomodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Current Opinion in Plant Biology.* **3**: 320-328.
- Parniske, M., Schmidt, P. E., Kosch, K., Müller, P.** (1994): Plant defense responses of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective *exoB* mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **7**(5): 631-638.
- Patriarca, E. J., Tate, R., Iaccarino, M.** (2002): Key role of bacterial NH_4^+ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**(2): 203-222.
- Payne, M. S., Jackson, E. N.** (1991): Use of alkaline phosphatase fusions to study protein secretion in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**(7): 2278-2282.
- Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W. J.** (2000): Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**(1): 180-201.
- Phillips, W. R., Streit, W.** (1996): Recombinant *Rhizobium meliloti* strains with extra biotin synthesis capability. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(9): 3333-3338.
- Pinsent, J.** (1954): The need for selenite and molybdate in the formation of dehydrogenase by members of the coliaerogenes group of bacteria. *Biochem. J.* **57**: 10-16.
- PromegaCorporation** (1995): fmol® DNA Sequencing System Technical Manual.
- Ramseier, T. M., Göttfert, M.** (1991): Codon usage and G + C content in *Bradyrhizobium japonicum* genes are not uniform. *Arch. Microbiol.* **156**(4): 270-276.

- Raza, S., Jornsgard, B., Abou-Taleb, H., Christiansen, J. L.** (2001): Tolerance of *Bradyrhizobium sp.* (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. Lett. Appl. Microbiol. **32**(6): 379-383.
- Reeves, R. H., Roth, J. R.** (1975): Transfer ribonucleic acid methylase deficiency found in UGA suppressor strains. J. Bacteriol. **124**(1): 332-340.
- Regensburger, B., Hennecke, H.** (1983): RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. **135**: 103-109.
- Reisser, W.** (1990): Participation of algal cell wall surface structures in the formation of the host-symbiont-interface of endocytobiotic systems. Cell Walls and Surfaces. Starr, R. C. Stuttgart, Springer Verlag.
- Requena, N., Fuller, P., Franken, P.** (1999): Molecular characterization of GmFOX2, an evolutionarily highly conserved gene from the mycorrhizal fungus *Glomus mossae*, down-regulated during the interaction with rhizobacteria. Mol. Plant Microbe Interact. **12**(10): 934-942.
- Reznikoff, W. S.** (1993): The Tn5 transposon. Annu. Rev. Microbiol. **47**: 945-963.
- Roche, P., Debelle, F., Maillet, F., Lerouge, P., Truchet, G., Denarie, J., Prome, J.-C.** (1991): Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. Cell. **67**: 125-130.
- Ross, J. P., Harper, J. A.** (1970): Effect of endogene mycorrhiza on soybean yields. Phytopathology. **60**: 1552-1556.
- Roth, L. E., Stacey, G.** (1989): Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. Eur. J. Cell Biol. **49**: 13-23.
- Rother, M., Resch, A., Wilting, R., Böck, A.** (2001): Selenoprotein synthesis in archaea. BioFactors. **14**: 75-83.
- Sadowsky, M. J., Olson, E. R., Foster, V. E., Kossiak, R. M., Verma, D. P. S.** (1988): Two host-inducible genes of *Rhizobium fredii* and the characterization of the inducing compounds. J. Bacteriol. **170**: 171-180.
- Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Vogeli-Lange, R., Aeschbacher, R. A., Lange, J., Wiemken, A., Kim, D., Cook, D. R., Boller, T.** (2000): Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. Mol. Plant Microbe Interact. **13**(7): 763-777.
- Sambasivarao, D., Turner, R. J., Simala-Grant, J. L., Shaw, G., Hu, J., Weiner, J. H.** (2000): Multiple roles for the twin arginine leader sequence of dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **275**(29): 22526-22531.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.** (1977): DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74**: 5463-5467.

Sanjuan, J., Carlson, R. W., Spaink, H. P., Bhat, U. R., Barbour, W. M., Glushka, J., Stacey, G. (1992): A 2-*O*-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 8789-8793.

Santini, C.-L., Ize, B., Chanal, A., Müller, M., Giordano, G., Wu, L.-F. (1998): A novel Sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **17**: 101-112.

Santos, R., Herouart, D., Puppo, A., Touati, D. (2000): Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in rhizobium-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* **38**(4): 750-759.

Santos, R., Herouart, D., Sigaud, S., Touati, D., Puppo, A. (2001): Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**(1): 86-89.

Sargent, F., Ballantine, S. P., Rugman, P. A., Palmer, T., Boxer, T. H. (1998): Reassignment of the gene encoding the *Escherichia coli* hydrogenase 2 small subunit--identification of a soluble precursor of the small subunit in a *hypB* mutant. *Eur. J. Biochem.* **255**(3): 746-754.

Sawers, G., Heider, J., Zehelein, E., Böck, A. (1991): Expression and operon structure of the *sel* genes of *Escherichia coli* and identification of a third selenium-containing formate dehydrogenase isoenzyme. *J. Bacteriol.* **173**: 4983-4993.

Schimper, A. F. W. (1883): Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot. Ztg.* **41**: 105-111; 121-131; 137-146.

Schippers, B., Bakker, A. W., Bakker, P. A. H. M. (1987): Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**: 339-358.

Schlaman, H. R. M., Okker, R. J. H., Lugtenberg, B. J. J. (1992): Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. *J. Bacteriol.* **174**: 5177-5182.

Schneider, K., Beck, C. F. (1987): New expression vectors for identifying and testing signal structures for initiation and termination of transcription. *Methods Enzymol.* **153**: 452-461.

Schofield, P. R., Gibson, A. H., Dudman, W. F., Watson, J. M. (1987): Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmids in a soil population. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(12): 2942-2947.

Schultes, A. C. (1990): Verwandtschaftsanalyse und genetische Charakterisierung von symbiotisch defekten *Bradyrhizobium japonicum* Mutanten. Fachbereich Biologie. Marburg, Philipps Universität Marburg.

Schwarz, K., Foltz, C. M. (1957): Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **70**: 3292-3293.

- Silver, R. P., Aaronson, W., Vann, W. F.** (1987): Translocation of capsular polysaccharides in pathogenic strains of *Escherichia coli* requires a 60-kilodalton periplasmic protein. *J. Bacteriol.* **169**(12): 5489-5495.
- Simon, R., Prüfer, U., Pühler, A.** (1983): A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technologie.* **1**: 784-791.
- Smit, G., Kijne, W. J., Lugtenberg, B. J. J.** (1987): Involvement of both cellulose fibrils and a Ca^{2+} -dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J. Bacteriol.* **169**(9): 4294-4301.
- Spaink, H.** (1999): Knocking out nodules. *Nature.* **402**: 135-136.
- Spaink, H., Kondorosi, A., Hooykaas, P. J. J.,** Eds. (1998): The Rhizobiaceae. Dordrecht (NL), Kluwer Academic Publishers.
- Spaink, H. P.** (1992): Rhizobial lipo-oligosaccharides: answer and question. *Plant Mol. Biol.* **20**: 977-986.
- Spaink, H. P.** (2000): Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 257-288.
- Stacey, G.** (1995): *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genetics. *FEMS Microbiol. Letters.* **127**: 1-9.
- Stacey, G., So, J.-S., Roth, L. E., Lakshmi, S. K. B., Carlson, R. W.** (1991): A lipopolysaccharide mutant of *Bradyrhizobium japonicum* that uncouples plant from bacterial differentiation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **4**: 332-340.
- Stadtman, T. C.** (1996): Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochemistry.* **65**: 83-100.
- Sullivan, J. T., Patrick, H. N., Lowther, W. L., Scott, D. B., Ronson, C. W.** (1995): Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**.
- Sullivan, J. T., Ronson, C. W.** (1998): Evolution of Rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 5145-5149.
- Terry, N., Zayed, A. M., De Souza, M. P., Tarun, A. S.** (2000): Selenium in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **51**: 401-432.
- Thanbichler, M., Böck, A.** (2001): Functional analysis of prokaryotic SELB proteins. *BioFactors.* **14**(1-4): 53-59.
- Tomkins, J. P., Wood, T. C., Stacey, M. G., Loh, J. T., Judd, A., Goicoechea, J. L., Stacey, G., Sadowsky, M. J., Wing, R. A.** (2001): A marker-dense physical map of the *Bradyrhizobium japonicum* genome. *Genome Res.* **11**(8): 1434-1440.

- Tormay, P., Böck, A.** (1997): Barriers to heterologous expression of a selenoprotein gene in bacteria. *J. Bacteriol.* **170**(3): 576-582.
- Tormay, P., Sawers, A., Böck, A.** (1996): Role of stoichiometry between mRNA, translation factor SelB and selenocysteyl-tRNA in selenoprotein synthesis. *Mol. Microbiol.* **21**(6): 1253-1259.
- Traxler, B., Lee, C., Boyd, D., Beckwith, J.** (1992): The dynamics of assembly of a cytoplasmic membrane protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**(8): 5339-5345.
- Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., De Billy, F., Prome, J.-C., Denarie, J.** (1991): Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit nodule organogenesis in alfalfa. *Nature.* **351**: 670-673.
- Trueb, L. F.** (1999): Die Sojabohne. *Naturw. Rundsch.* **52**: 301-305.
- Tully, R. E.** (1985): New culture media to suppress exopolysaccharide production by *Rhizobium japonicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 252-254.
- Tuve, T., Williams, H. H.** (1961): Metabolism of selenium by *Escherichia coli*: biosynthesis of selenomethionine. *J. Biol. Chem.* **236**: 597-601.
- Van Brussel, A. A. N., Bakhuizen, R., Van Spronsen, P. C., Spaink, H. P., Tak, T., Lugtenberg, B. J. J., Kijne, W. J.** (1992): Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science.* **257**: 70-72.
- Van De Peer, Y., Rensing, S. A., Maier, U. G., De Wachter, R.** (1996): Substitution rate calibration of small subunit ribosomal RNA identifies chlorarachniophyte endosymbionts as remnants of green algae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 7732-7736.
- Van Mellaert, L., Mei, L., Lammertyn, E., Schacht, S., Anne, J.** (1998): Site-specific integration of bacteriophage VWB genome into *Streptomyces venezuelae* and construction of a VWB-based integrative vector. *Microbiology.* **144**: 3351-3358.
- Van Rhijn, P., Fang, Y., Galili, S., Shaul, O., Atzmon, N., Wininger, S., Eshed, Y., Lum, M., Li, Y., To, V., Fujishige, N., Kapulnik, Y., Hirsch, A. M.** (1997): Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhiza and Rhizobium-induced nodules be conserved. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 5467-5472.
- Van Rhijn, P., Vanderleyden, J.** (1995): The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**: 124-142.
- Van Spronsen, P. C., Bakhuizen, R., Van Brussel, A. A. N., Kijne, W. J.** (1994): Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two step process. *Eur. J. Cell Biol.* **64**: 88-94.
- Vance, C. P.** (1983): *Rhizobium* infection and nodulation: a beneficial plant disease? *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 399-424.

- Verma, D. P. S.** (1992): Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell*. **4**: 373-382.
- Verma, D. P. S., Haugland, R., Brisson, N., Legocki, R. P., Lacroix, L.** (1981): Regulation of the expression of leghaemoglobin genes in effective and ineffective root nodules of soybean. *Biochim. Biophys. Acta*. **653**(1): 98-107.
- Verma, D. P. S., Kazazian, V., Zogbi, V., Bal, A. K.** (1978): Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *J. Cell. Biol.* **78**: 919-939.
- Voet, D., Voet, J. G.** (1992): *Biochemie*. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Volff, J.-N., Altenbuchner, J.** (1997): Influence of disruption of the *recA* gene on genetic instability and genome rearrangement in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **179**(7): 2440-2445.
- Voordouw, G.** (2000): A universal system for the transport of redox proteins: early roots and latest developments. *Biophys. Chem.* **86**(2-3): 131-140.
- Walter, A. E., Turner, D. H., Kim, J., Lyttle, M. H., Muller, P., Mathews, D. H., Zuker, M.** (1994): Coaxial stacking of helices enhances binding of oligoribonucleotides and improves predictions of RNA folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**: 9218-9222.
- Weiss, R., Lindsley, D., Falahee, B., Gallant, J.** (1988): On the mechanism of ribosomal frameshifting at hungry codons. *J. Mol. Biol.* **203**: 403-410.
- Werner, D.** (1992): *Symbiosis of plants and microbes*. London (UK), Chapman & Hall.
- Werner, D., Wilcockson, J., Zimmermann, E.** (1975): Adsorption and selection of Rhizobia with ion-exchange papers. *Arch. Microbiol.* **105**: 27-32.
- West, S. A., Kiers, E. T., Simms, E. L., Denison, R. F.** (2002): Sanctions and mutualism stability: why do rhizobia fix nitrogen? *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol.* **269**(1492): 685-694.
- Whitehead, L. F., Day, D. A.** (1997): The peribacteroid membrane. *Physiol. Plant.* **100**: 30-44.
- Wilcockson, J., Werner, D.** (1978): Nitrogenase activity of *Rhizobium japonicum* growing on agar surfaces in relation to slime production, growth and survival. *J. Gen. Microbiol.* **108**: 151-160.
- Wolfe, S. L.** (1993): *Molecular and cellular biology*. Belmont, USA, Wadsworth Publishing Company.
- Wood, J. M., Bremer, E., Csonka, L. N., Kraemer, R., Poolman, B., Van der Heide, T., Smith, L. T.** (2001): Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **130**(3): 437-460.

- Worrall, D. M.** (1996): Protein Purification Protocols. Totowa (USA), Humana Press Inc.
- Yajko, D. M., Hegeman, G. D.** (1971): Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: specific transfer of bacterial deoxyribonucleic acid to plant tissue. J. Bacteriol. **108**(3): 973-979.
- Yanagi, M., Yamasato, K.** (1993): Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. FEMS Microbiol. Letters. **107**: 115-120.
- Yang, W. C., Katinakis, P., Hendriks, P., De Vries, F., Spee, J., Van Kammen, A., Bisseling, T., Franssen, H.** (1993): Characterization of GmENOD40, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. Plant J. **3**: 573-585.
- Yokogawa, T., Suzuki, T., Ueda, T., Mori, M., Ohama, T., Kuchino, Y., Yoshinari, S., Motoki, I., Nishikawa, K., Osawa, S.** (1992): Serine tRNA complementary to the nonuniversal serine codon CUG in Candida cylindracea: evolutionary implications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**(16): 7408-7411.
- Young, J. P. W., Wexler, M.** (1988): Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. **134**: 2731-2739.
- Zabin, I., Fowler, A.** (1970): β -galactosidase and thiogalactosidase transacetylase. The lactose operon, Cold Spring Harbour Laboratory.
- Zhulin, I. B., Bessalov, V. A., Johnson, M. S., Taylor, L. B.** (1996): Oxygen taxis and proton motive force in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. **178**(17): 5199-5204.
- Zinoni, F., Heider, J., Böck, A.** (1990): Features of the formate dehydrogenase mRNA necessary for decoding of the UGA codon as selenocysteine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**: 4660-4664.
- Zuker, M., Jaeger, J. A., Turner, D. H.** (1991): A comparison of optimal and suboptimal RNA secondary structures predicted by free energy minimization with structures determined by phylogenetic comparison. Nucleic Acids Res. **19**: 2707-2714.



Interaktion

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)

Ludwig Maximillan Universität München
Prof. A. Böck, Dr. M. Rother

Philipps-Universität Marburg
Prof. A. Klein, Dr. I. Noll, Dr. S. Müller

Philipps-Universität Marburg
Prof. D. Werner, Dr. P. Müller,
B. U. Becker

Philipps-Universität Marburg
Prof. E. Mörschel, Prof. U. Maier, M. Johannsen

Universität Bielefeld
PD Dr. A. Becker

Clemson University (Clemson, USA)
Prof. J. P. Tomkins

University of Tennessee (Knoxville, USA)
Prof. G. Stacey

Erklärung

Ich versichere hiermit, daß ich meine Dissertation „Identifizierung und Analyse neuer symbioserelevanter Genorte in *Bradyrhizobium japonicum* 110spc4“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den2002

(Bernd Ulrich Becker)

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Werner, sowohl für die zur Verfügung Stellung von Laborgelegenheiten und finanziellen Mitteln als auch für Rat und Tat beim Anfertigen der Arbeit.

Besonderer Dank gilt natürlich Herrn Dr. P. Müller für die anspruchsvolle Aufgabenstellung, die gute Betreuung und die Unterstützung in jeglicher Form während der Durchführung der Arbeiten im Labor.

Sehr wichtig zu erwähnen ist mein Dank an die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), innerhalb deren Sonderforschungsbereich 395 meine Arbeit finanziert und gefördert wurde.

Der gesamten Arbeitsgruppe Werner gilt für die tatkräftige Zusammenarbeit und das positive Arbeitsklima mein herzlicher Dank.

Stellvertretend erwähnen möchte ich hier nur folgende Personen:

Heidmarie Thierfelder und Andrea Buchholz, die mir fachlich wie auch menschlich immer uneingeschränkte Unterstützung boten; Gertrud Wiedemann, Danny Stingel, Felix Kirchner und Ralf Pöschke, die im Laboralltag eine unverzichtbare Hilfe waren; Anja Unnewehr, die viele Vorarbeiten geleistet hat und trotz Schwangerschaften wichtige und gute Einflüsse gab; Eike terHaseborg, dessen positive Ausstrahlung und fundierte Computerkenntnis oft wichtige Anstöße gaben; Deanny Stein und Lucette Claudet, die mir nicht nur in bürokratischen und bürotechnischen Angelegenheiten ständig zur Seite standen; alle KorrekturleserInnen, die bei Grob- und Feinschliff der Arbeit einen unersetzlichen Beitrag leisteten; und last but not least Ingrid Meinhard, die den guten Geist der Arbeitsgruppe verkörpert.

Darüberhinaus gebührt auch der Belegschaft der Werkstatt mein Dank für ihren immerwährenden Einsatz beim Erstellen und Wiederherstellen von dringend notwendigen Gerätschaften, sowie den Damen und Herren von der Wachmannschaft, die auch zu spätester Stunde freundlich und immer hilfsbereit waren.

My special thanks go to Dr. Helen Steele, for her neverending support and the fruitful discussions on any possible topic.

Herrn Prof. Dr. A. Klein und seinen Mitarbeitern Dr. Izabella Noll und Dr. Steffen Müller danke ich für die hilfreichen Gespräche und Diskussionen bei den ersten Gedankenspielen bezüglich des Selenocystein Einbaus und den möglichen stem loop Strukturen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Böck und seinen Mitarbeitern, vor allem Herrn Dr. Michael Rother, für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe Versuche zum Selen-Einbau durchführen zu können bedanken. Darüberhinaus haben die ausführlichen Gespräche einen wichtigen Beitrag zu der Analyse der Versuchsergebnisse erbracht.

Bei Herrn Dr. Vincent Boiffin möchte ich mich für seinen Einsatz bei der langwierigen Arbeit zur Überexpression in *E. coli* bedanken.

Frau PD Dr. Anke Becker und ihren Mitarbeitern gilt mein Dank für die HPLC Analyse der Exopolysaccharide und die tolle Zusammenarbeit.

Des weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. G. Stacey, Prof. Dr. J. P. Tomkins und deren Mitarbeitern für die Untersuchungen zur Lokalisierung im Genom von *B. japonicum* 110 sowie für die DNA Sequenz des potentiellen Selen bindenden Proteins bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Mörschel, Frau Marianne Johannsen und Herrn Prof. Dr. U. Maier für die tatkräftige Mitarbeit bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen und den angrenzenden Versuchen sowie deren Auswertung.

Meinen Freunden, meiner WG und meinem Team möchte ich für ihr Verständnis, ihre Loyalität und ihre Rückendeckung danken ... und ab!

Am meisten zu danken habe ich ohne Zweifel meiner Familie, meine Worte sind dafür allerdings zu wenig und auch der Duden stellt hier leider keine adäquaten Formulierungen zur Verfügung.

Ludwig, Ursula, Peter, Harald und Peggy, eure Liebe ist mein ganzer Halt!

„May those, who love us, love us.
And those, who don't love us,
may god turn their hearts.
And if he can not turn their hearts,
may he turn their ancles,
so that we may know them by their limping.“

Paulie Chopra